



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119569846 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 07

(21) 申请号 202411517594.3

A61P 31/04 (2006.01)

(22) 申请日 2019.10.04

C12N 15/12 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/18 (2006.01)

62/742,102 2018.10.05 US

(62) 分案原申请数据

201980063976.4 2019.10.04

(71) 申请人 国家儿童医院研究所

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 史蒂文·大卫·古德曼

劳伦·奥普雷马克·巴卡莱茨

(74) 专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理

事务所(普通合伙) 44348

专利代理师 何锦标 张玉颖

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

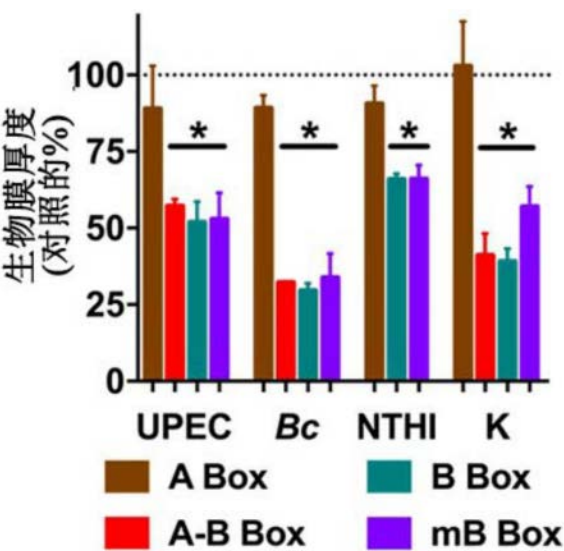
权利要求书3页 说明书42页 附图6页

(54) 发明名称

用于移除生物膜的HMGB1蛋白衍生物

(57) 摘要

本文提供了HMGB1的衍生物,其已被工程改造来具有相同的有效抗生物膜活性,但更小且不引起炎症。



1. 一种分离的B Box多肽,其包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。
2. 一种分离的B Box多肽,其通过以下方式制备:在表达多核苷酸的条件下,使表达编码权利要求1所述的分离的多肽的分离的多核苷酸的原核细胞生长,并且分离所述多肽。
3. 根据权利要求2所述的分离的B Box多肽,其中所述原核细胞是大肠杆菌细胞。
4. 一种分离的B Box多肽,其通过化学合成权利要求1所述的分离的多肽而制备。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的多肽,其进一步包含可检测的标记。
6. 一种抗体,其识别并结合权利要求1-5中任一项所述的分离的多肽,或该抗体的抗原结合片段。
7. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其进一步包含可检测的标记。
8. 一种组合物,其包含载体和一种或多种权利要求1所述的分离的多肽。
9. 一种组合物,其包含载体和权利要求6或7所述的抗体或抗原结合片段。
10. 根据权利要求8或9所述的组合物,其中所述载体是药学上可接受的载体。
11. 一种多核苷酸,其编码权利要求1所述的分离的多肽,或该多核苷酸的互补序列。
12. 一种多核苷酸,其编码权利要求6所述的抗体或抗原结合片段,或该多核苷酸的互补序列。
13. 根据权利要求11或12所述的多核苷酸,其可操作地连接至启动子和/或增强子。
14. 根据权利要求11或12所述的多核苷酸,其进一步包含可检测的标记。
15. 一种载体,其包含权利要求11或12所述的多核苷酸。
16. 根据权利要求15所述的载体,其中所述载体是质粒或病毒载体。
17. 一种分离的宿主细胞,其包含以下中的一种或多种:权利要求1至5中任一项所述的多肽,权利要求6或7所述的抗体或抗原结合片段,权利要求11-14中任一项所述的多核苷酸,或权利要求15或16所述的载体。
18. 一种组合物,其包含权利要求17所述的宿主细胞和载体。
19. 根据权利要求18所述的组合物,其中所述载体是药学上可接受的载体。
20. 一种用于抑制、竞争或滴定生物膜中DNABII多肽或蛋白与微生物DNA结合的体外方法,其包括使所述DNABII多肽或蛋白或微生物DNA与权利要求1-5中任一项所述的多肽接触,从而抑制、竞争或滴定所述DNABII蛋白或多肽与微生物DNA的结合,其中所述生物膜是由选自以下的生物体产生的:尿路致病性大肠杆菌(*Escherichia coli*) (UPEC)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumonia*)、新洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cenocepacia*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、假伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) (不可分型) (NTHI)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)或ESKAPE病原体。
21. 一种用于抑制、预防或破坏微生物生物膜的体外方法,其包括使所述生物膜与权利要求1-5中任一项所述的多肽接触,并且所述生物膜是由选自以下的生物体产生的:尿路致病性大肠杆菌(*Escherichia coli*) (UPEC)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumonia*)、新洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cenocepacia*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、无乳

链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、假伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (不可分型) (NTHI)、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 或ESKAPE病原体,从而抑制、预防或破坏微生物生物膜。

22. 药剂在制备用于在对象中抑制、预防或破坏生物膜的药剂中的用途,其中所述药剂包含权利要求1-5中任一项所述的多肽,并且其中所述生物膜是由选自以下的生物体产生的:尿路致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (UPEC)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、新洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、假伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (不可分型) (NTHI)、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 或ESKAPE病原体。

23. 药剂在制备用于抑制、预防或治疗在对象中产生生物膜的微生物感染的药剂中的用途,其中所述药剂包含权利要求1-5中任一项所述的多肽,其中所述生物膜是由选自以下的生物体产生的:尿路致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (UPEC)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、新洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、假伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (不可分型) (NTHI)、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 或ESKAPE病原体。

24. 药剂在制备用于在对象中破坏生物膜和清除而不增强或诱导炎症反应的药剂中的用途,其中所述药剂包含权利要求1-5中任一项所述的多肽,其中所述生物膜是由选自以下的生物体产生的:尿路致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (UPEC)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、新洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、假伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (不可分型) (NTHI)、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 或ESKAPE病原体。

25. 药剂在制备用于在有需要的对象中治疗由于生物膜的存在而引起的感染或病症的药剂中的用途,其中所述药剂包含权利要求1-5中任一项所述的多肽,其中所述生物膜是由选自以下的生物体产生的:尿路致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (UPEC)、肺炎克雷伯

氏菌 (*Klebsiella pneumonia*)、新洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、假伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (不可分型) (NTHI)、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 或ESKAPE病原体。

26. 根据权利要求20至25中任一项所述的方法或用途, 其中所述生物膜是由选自以下的生物体产生的: 尿路致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (UPEC)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumonia*)、新洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (不可分型) (NTHI) 或ESKAPE病原体。

27. 根据权利要求22至25中任一项所述的用途, 其中所述对象是哺乳动物。

28. 根据权利要求27所述的用途, 其中所述哺乳动物是人。

29. 根据权利要求28所述的用途, 其中所述人是婴儿或青少年。

30. 根据权利要求22至25中任一项所述的用途, 其还包括施用抗微生物剂。

31. 一种试剂盒, 其包含以下中的一种或多种以及使用说明书: 权利要求1至5中任一项所述的分离的多肽, 权利要求6或7所述的抗体, 或权利要求11-14中任一项所述的多核苷酸。

用于移除生物膜的HMGB1蛋白衍生物

[0001] 本申请为2021年03月29日进入中国国家阶段、申请号为201980063976.4、申请日为2019年10月04日、发明名称为“用于移除生物膜的HMGB1蛋白衍生物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

本申请根据35U.S.C.§119(e)要求于2018年10月5日提交的美国临时申请序列号62/742,102的优先权,其全部内容通过引用合并于此。

[0003] 联邦支持声明

本发明是在美国国立卫生研究院(NIH)授予的批准号R01DC011818的政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0004] 本发明总体上涉及减少和/或治疗临床或工业细菌生物膜的方法和组合物。

背景技术

[0005] 细菌在人体内的生物膜中的持久性引起所有慢性/复发性疾病的约三分之二。这些生物膜由受外部“粘液(slime)”保护的细菌组成,外部“粘液”通常主要由阻止先天性和适应性免疫系统、抗生素和其他抗菌剂接触生物膜内部的细菌的DNA组成。生物膜使其极其难以清除来自身体的感染。此外,生物膜可以充当未来急性感染的储存库,通常会带来致命的后果。

[0006] 在所有已知的真细菌中发现了来自DNABII蛋白家族的至少一种蛋白,并且天然存在于细菌细胞外。尽管它们引起强烈的先天免疫应答,但宿主对象由于感染而未能自然产生针对家族成员的特异性抗体。细菌生物膜的主要问题是宿主免疫系统和/或抗生素和其他抗菌剂无法进入生物膜内受保护的细菌。

[0007] 生物膜也存在于工业环境中。例如,从生产现场到加油站储罐,生物膜都涉及广泛的石油加工问题。在该领域中,减少硫酸盐的生物膜细菌会产生硫化氢(酸油)。在工艺流程中,生物膜的活动会形成粘液,这些粘液会阻碍过滤器和孔口。生物膜和生物膜生物还会引起管道和石油加工设备的腐蚀。这些问题可以在整个石油或天然气生产设施中表现出来,甚至可以在最终产品储罐的表面上发现积垢和腐蚀性生物膜生物。

[0008] 在家庭中,在支持微生物生长的任何表面中或表面上存在生物膜,例如在下水道中、在食物制备表面上、在厕所中以及在游泳池和温泉中。

[0009] 生物膜与家庭和工业的各种水处理有关。它们会在加工设备的表面上生长并阻碍设备的性能,例如传热的降低或过滤器和膜的堵塞。在冷却塔填料上生长的生物膜会增加足以导致填料塌陷的重量。生物膜甚至会腐蚀高度专业化的不锈钢。水处理过程中的生物膜会降低最终产品的价值。在饮用水分配系统中生长的生物膜可能会隐藏潜在的病原生物、腐蚀性生物或细菌,从而降低水的美观质量。

[0010] 因此,需要突破生物膜的保护性屏障以治疗或杀死相关的细菌感染并从表面和水

系统中清除它们。本发明满足了这种需求并且还提供了相关的优点。

[0011] 概述

众所周知,细菌生物膜对现有的治疗方式具有顽强的抵抗力(例如,其对抗微生物剂的抵抗力比其浮游生物膜高>1000倍)。由于生物膜介导的感染的可归因的死亡率和经济负担方面的高流行和巨大后果,迫切需要新颖的治疗方法。生物膜的定义特征之一是细胞外聚合物,其中嵌入了生物膜细胞。细胞外聚合物的关键成分是细胞外DNA和细菌DNABII蛋白质家族,它们对生物膜的结构完整性至关重要。靶向和隔离DNABII蛋白会破坏生物膜。高迁移率族B1(High Mobility Group B1, HMGB1)蛋白是一种与DNA结合的真核蛋白,与DNABII蛋白结合到相同的DNA结构上,从而导致细菌生物膜的破坏。HMGB1的衍生物可以经过改造,以具有相同的有效抗生物膜活性,但体积更小并且不会引起炎症。

[0012] 申请人在本文中公开了通过重新利用先天免疫效应子的衍生物来治疗细菌生物膜介导的感染的新概念。HMGB1结构域在功能上有所不同。具有抗生物膜活性且无促炎结局的结构域变体代表了HMGB1的一个实施方案,用于治疗生物膜介导的感染而没有过度炎症的后果。体内和离体实验表明,针对细菌核昔相关蛋白(IHF和HU)的DNABII家族的抗体对引起多种顽固性人类感染的许多不同细菌生物膜非常有效。相反,本发明利用免疫反应组分HMGB1来治疗生物膜介导的疾病,而没有过度炎症的后果。体外细菌生物膜暴露于HMGB1及其各种截短结构域(A box、B box、B box接头、突变的B box C106S、AB box以及全部带有接头)的抗生物膜特性。

[0013] 包含蛋白质衍生物的组合物和制剂可用于治疗顽固性或慢性或复发性生物膜介导的感染。该组合物可用于治疗抗药性医院感染(包括与留置的医疗器械有关的感染,例如与导管或假体有关的感染,以及在慢性/复发性感染(例如囊性纤维化患者)中的耳部感染和呼吸道感染)。另外,由于已经证明从生物膜释放的许多细菌对宿主防御和抗菌剂都更敏感,因此它们可以与已建立的治疗方法(即抗生素)结合使用。

[0014] 因此,在一个方面,本发明提供了一种分离的A Box多肽,其任选地包含一个或多个选自K12、C23和C45的氨基酸突变(例如,天然的K或C被修饰为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸)或其等效物,所述等效物包含一个或多个选自K12、C23和C45的氨基酸突变(例如,天然的K或C被修饰为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸),或基本上由其组成,或由其组成。一方面,该突变是C45S突变。A Box多肽可以进一步包含位于一个或两个末端的接头或肽序列。非限制性实例是序列PPKGGETKKKF的多肽接头。当重组产生时,A Box多肽可以被部分或完全乙酰化、氧化或磷酸化。一方面,A Box多肽包含野生型HMGB1多肽的氨基酸1至70,其任选地包含一个或多个上述鉴定的突变,或基本上由其组成,或由其组成。

[0015] 本文还提供了分离的B Box多肽,其任选地包含在氨基酸C106处的突变(例如,天然的半胱氨酸变为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸)或其等效物,所述等效物包含在氨基酸C106处的突变(例如,天然的半胱氨酸变为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸),或基本上由其组成,或由其组成。一方面,B Box多肽包含HMGB1多肽的氨基酸约80至约176、或约88至约164、或约89至约162、或约80至约164,或基本上由其组成,或由其组成。用于修饰野生型HMGB1 B Box多肽的其他位置在图1C中示出。

[0016] B Box多肽可以进一步包含位于一个或两个末端的接头或肽序列。非限制性实例是序列PPKGETKKKF的多肽接头。当重组产生时,公开的B Box多肽可以被部分或完全乙酰化、氧化或磷酸化。

[0017] 在另一方面,本文提供了分离的AB Box多肽,其任选地包含一个或多个选自K12、C23、C45或C106的氨基酸突变(例如,天然的K或C被修饰为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸)或其等效物,该等效物包含一个或多个选自K12、C23和C45的氨基酸突变(例如,天然的K或C被修饰为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸),或基本上由其组成,或由其组成。一方面,该突变是C45S突变。在另一方面,该多肽包含在氨基酸C106处的突变(例如天然的半胱氨酸变为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸)或其等效物,该等效物包含一个或多个选自K12、C23、C45的氨基酸突变和在氨基酸C106处的突变(例如天然的半胱氨酸变为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸)。一方面,AB Box多肽及等效物包含C45S和C106S突变。一方面,AB Box多肽或其等效物包含野生型HMGB1多肽的氨基酸1至176、或1至162、或1至164,其具有所提出的氨基酸突变,或基本上由其组成,或由其组成。

[0018] 在另一方面,分离的AB Box多肽进一步包含连接A Box多肽和B Box多肽的接头多肽,并且在一方面,还包含连接B Box和C Box多肽的第二接头。非限制性实例是序列PPKGETKKKF的多肽接头。当重组产生时,AB或A、B和C Box多肽可以被部分或完全乙酰化、氧化或磷酸化。一方面,分离的突变的HMGB1多肽在A和/或B Box结构域中具有如本文所述的1个或更多个氨基酸取代,其可以任选地被部分或完全乙酰化、氧化或磷酸化。

[0019] 在一方面,分离的多肽进一步包含可检测的标记。

[0020] 本文还提供了一种重组多肽,其包含一个或多个如本文所述的分离的多肽、或基本上由其组成、或由其组成,还包含位于一个或两个末端的至少一个另外的氨基酸。

[0021] 本发明还提供了结合本文所述的突变多肽或针对其产生的抗体。该抗体可用作诊断剂和预后剂。进一步提供了本文所述的一种或多种分离的多肽和/或抗体以及载体,例如药学上可接受的载体。

[0022] 本发明还提供了编码如本文所述的分离的多肽或抗体及其互补序列的多核苷酸。一方面,多核苷酸被可检测地标记。多核苷酸可以任选地与启动子和/或增强子可操作地连接以表达多核苷酸。还提供了一种重组产生多肽的方法,其通过在合适的表达系统(例如宿主细胞)中表达多核苷酸,然后产生并分离重组产生的多肽。

[0023] 进一步提供了一种载体,其包含本文所述的多核苷酸,或基本上由其组成,或由其组成。

[0024] 在另一方面,本文提供一种分离的宿主细胞,其包含本文所述的多肽、多核苷酸、或载体中的一种或多种。还提供了包含载体和本文所述的多肽、多核苷酸或载体中的一种或多种的组合物。一方面,载体是药学上可接受的载体。

[0025] 多肽和包含它们的组合物具有多种用途。例如,可以将它们用于抑制、竞争或滴定DNABII多肽或蛋白质与微生物DNA的结合的方法,该方法使DNABII多肽或蛋白质或微生物DNA与本文所述的多肽或组合物接触。它们还可以用于抑制、预防或破坏微生物生物膜的方法,该方法使生物膜与本文所述的多肽或组合物接触。

[0026] 所述多肽和组合物还可以用于抑制、预防或破坏对象体内的生物膜或治疗与生物

膜相关的感染或疾病的方法,该方法向对象施用有效量的本文所述的组合物或多肽。

[0027] 所述多肽和组合物可以进一步用于抑制、预防或治疗在对象中产生生物膜的微生物感染的方法,该方法向对象施用有效量的本文所述的组合物或多肽。

[0028] 所述方法可以进一步包括接触或施用有效量的另外的试剂,例如抗微生物剂,以治疗潜在的感染。

[0029] 可以通过这些方法治疗的生物膜和感染可以由细菌感染引起,例如由以下引起的感染:ESKAPE病原体、尿路致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (UPEC)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumonia*)、新洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*)、表皮葡萄球菌 (*S.epidermidis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*)、假伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (不可分型) (NTHI)、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 或结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)。由生物膜引起的与设备相关的感染包括,例如,心室衍生、隐形眼镜、气管插管、人工心脏瓣膜、起搏器、以及血管移植物、组织填充物和乳房植入物、外周血管导管、尿液导管、骨科植入物和假肢关节上的感染。可以通过该组合物和方法治疗的与组织相关的感染包括,例如,慢性中耳炎、慢性鼻窦炎、慢性扁桃体炎、牙菌斑、慢性喉炎、心内膜炎、肺部感染(上、中、下气道感染(中耳炎、鼻窦炎、支气管炎、以及慢性阻塞性肺病(COPD)的加重)、慢性咳嗽、囊性纤维化(CF)和社区获得性肺炎(CAP)的并发症和/或主要病因、肾结石、胆道感染、尿路感染、伯克霍尔德氏菌感染、骨髓炎、表皮伤口和慢性伤口。

[0030] 所述对象可以是哺乳动物,例如人、或婴儿或青少年。

[0031] 还提供了一种试剂盒,其包含本文所述的分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞或组合物以及使用说明,或者由其组成,或者由其组成。

附图说明

[0032] 图1A-1D:HMGB1、DNABII/HMGB1-DNA复合体的结构。(图1A) HMGB1由3个结构域组成:A Box、B Box和酸性C尾巴。A+B Box主要是DNA结合结构域(括号),而C尾部则介导核功能、转录刺激和抗菌活性。示出了每个结构域的AA(左侧)。C23和C45可以形成二硫键,导致DNA结合亲和力降低和促炎活性增加。C106通过RLR4-MD2结合介导促炎活性。已显示C106S突变可减少促炎反应,而不会失去结合。(图1B) 左图:与DNA结合的IHF二聚体。IHF的 β 色带臂穿过小沟以使DNA弯曲,从凹面将分子包裹在N端 α 螺旋周围。右图:与DNA结合的2个HMGB1 A Box结构域;模拟天然HMGB1中的A Box和B Box结合。 α 螺旋结合小沟,使DNA分子从凸面弯曲。修饰自PDB 4QR9。HMGB1多肽的氨基酸序列、截短体、融合体和突变形式在下文的序列表中提供。(图1C) HMGB1 B Box构建体由N端和C端接头以及两个预测的 α -局部区域以及它们之间的柔性接头组成。B Box中的多个氨基酸(AA)可以进行翻译后修饰(PTM,Lys的乙酰化/甲基化,Asn的糖基化,Tyr的磷酸化,Cys的氧化)。但是,在来自LC-MS/MS分析的rHMGB1或nHM观察到的肽中,>20%都没有B Box PTM。(图1D) 截短体从N和C末端以及两个 α 螺旋区域

中的一个移除柔性接头。相信两个最小的螺旋区域截短体(AA 99-133,138-164)保留抗生物膜活性。

[0033] 图2:HMGB1介导的生物膜塌陷模型。DNABII蛋白通过结合类似于霍利迪连接体(HJ)的顶点结构来稳定eDNA支架。抗体(Y)可以隔离DNABII蛋白并改变动态平衡,从而导致塌陷。HMGB1还可以通过结合DNA并形成瞬时的、不稳定的中间体(括号)来破坏eDNA的结构。

[0034] 图3:HMGB1的结构和构建的变体。在大肠杆菌中表达的全长重组HMGB1(rHMGB1)包含3个结构域,由A Box、B Box和C尾组成。HMGB1 AB Box结构由A和B结构域以及B box和C尾之间的C末端接头组成,但缺少C尾。A box构建体包含A box和A box与B box之间的C末端接头,但缺少B-box和C尾。B box构建体包含N和C末端接头,但缺少A Box和C尾。创建了rHMGB1(mHMGB1)中的C45S突变和B Box中的C106S突变(mB Box)以降低HMGB1的促炎活性。也参见图1。

[0035] 图4:HMGB1变体保持DNA结合能力。将浓度递增(100和250nM)的市售牛HMGB1(bHMGB1)、B Box C106S(mB Box)、rHMGB1、HMGB1 C45S(mHMGB1)、A Box、B Box和A+B Box与5'末端孵育标记的6-羧基荧光素标记的霍利迪连接体(HJ)DNA(20nM)孵育,然后在6%非变性聚丙烯酰胺凝胶上分离。如HJ迁移差异所说明的, HMGB1和HMGB1变体保留了DNA结合活性。

[0036] 图5A-5E:HMGB1变体对高优先级细菌病原体的抗斑点效应。将所示的HMGB1变体或针对DNABII蛋白的抗体(α -1HF_{Ec} 1gG, 1 μ M)在24h体外添加到各自预先形成的细菌生物膜中。孵育16小时后,将生物膜用LIVE/DEAD®染色,然后通过共聚焦激光扫描显微镜观察。通过COMSTAT分析图像以计算平均厚度,并绘制与对照的对比图。(图5A)将全长HMGB1同种型(除非另外指出,否则为200nM)添加至UPEC、新洋葱伯克霍尔德氏菌、NTHI、或ESKAPE病原体。添加了800nM rHMGB1和200nM mHMGB1用于金黄色葡萄球菌(ESKAPE)。添加了800nM rHMGB1、800nM mHMGB1、或3.3 μ M的 α -1HF_{Ec} 1gG用于屎肠球菌,并孵育了1小时(而不是16小时),以免被屎肠球菌蛋白酶降解。(图5B)与浓度增加的rHMGB1一起孵育的UPEC生物膜的代表性图像。(图5C)如上所述测试HMGB1(200nM)的各个结构域的抗血红蛋白活性(虚线表示对照值)。条形代表SEM。与对照组相比的统计学显著性采用未配对t检验评估,*P<0.05。HMGB1及其变体(A Box不能)能够显著破坏由高优先级人类病原体形成的已建立生物膜。(图5D-5E) HMGB1和变异体破坏了预先形成的肺炎克雷伯菌生物膜。在24小时将rHMGB1、HMGB1 C45S(mHMGB1)、牛HMGB1(bHMGB1)、B box、B Box C106S(mB Box)、A Box、以及A+B Box(200nM)添加到预先形成的肺炎克雷伯菌生物膜中。孵育16小时后,将生物膜用LIVE/DEAD®染色,然后通过共聚焦激光扫描显微镜观察。通过COMSTAT分析图像以计算平均厚度和总生物量。误差条代表SEM。***P<0.0001;ns=不显著。HMGB1及其变体(A Box不能)显著破坏了已建立的肺炎克雷伯菌生物膜。

[0037] 图6:HMGB1变体破坏致病生物膜。如上所述测试HMGB1(200nM)的各个结构域的抗生物膜活性(虚线表示对照值)。条形代表SEM。*P<0.05。HMGB1及其变体(而A Box不能)能够显著破坏由高度优先的人类病原体形成的已建立的生物膜。

[0038] 图7A-7G:HMGB1促进从小鼠中清除葡萄球菌,而不会引起败血症。用107CFU气管内攻击C57BL/6小鼠,同时(预防)或24小时后(治疗)接受0.2nmol的HMGB1变体。(图7A)通过荧光显微镜在用 α -新洋葱伯克霍尔德氏菌抗体探测的肺切片中可以看到新洋葱伯克霍尔德

氏菌的聚集体。对于预防, (图7B) 分析了接种后18小时(h post-inoculation, hpi)收集的支气管肺泡灌洗液(BAL)的CFU。(图7C)通过差分细胞计数来定量BAL中的中性粒细胞。(图7D)将72hpi收集的肺组织固定、包埋、切片并用苏木精和曙红染色(放大10倍)。对于治疗, 72hpi (图7E)在BAL中定量CFU。(图7F)通过用 α -CD45、 α -CD11b和 α Ly-6G染色的腹腔灌洗液的荧光激活的细胞分选, 在腹腔内(i.p.)施用HMGB1衍生物后24小时分析了中性白细胞的募集。(图7G)通过在腹腔注射有0.2nmol HMGB1变体、5mg/kg LPS或两者兼有的小鼠中的ELISA测定血清TNF- α 。LoD: 检测极限。条形代表SD。 $*P<0.05$ 。HMGB1治疗显著降低了肺部新洋葱伯克霍尔德氏菌CFU, HMGB1从Cys到Ser的突变消除了促炎活性, 并且这些HMGB1变体均未引起败血症。

[0039] 图8A-8F: 在实验性中耳炎模型中, rHMGB1和mHMGB1促进了生物膜的解离。在用NTHI攻击后第4天和第5天, 将稀释剂、0.2nmol rHMGB1、或0.2nmol mHMGB1直接递送至黄鼠的中耳。24小时后处死动物, 对中耳成像(图8C, 代表性图像), 并根据(图8A, 生物膜)和(图8B, 炎症)中所述的标准, 对生物膜(图8D)和炎症(图8F)的存在进行盲评分。定量存在于粘膜物质中的NTHI的CFU(图8E)。绘制平均值和SEM。 $**P<0.01$, $***P<0.0001$ 。图像评分和CFU定量证明, rHMGB1和mHMGB1均促进了体内已建立的NTHI生物膜的清除。值得注意的是, mHMGB1并未诱发明显的炎症。

[0040] 图9: HMGB1增强抗生素介导的杀伤作用。形成新洋葱伯克霍尔德氏菌生物膜24小时, 然后添加米诺环素(1 μ g/ml)、rHMGB1(200nM)、或rHMGB1(200nM)+米诺环素(1 μ g/ml)另外的16h。生物膜用LIVE/DEAD®染色并通过CLSM成像。活细胞以绿色表示, 死细胞以红色表示。注意到, 仅在同时存在HMGB1和米诺环素的情况下, 死细胞才会增加。

[0041] 图10A-10B: 生物膜相关疾病的标本中的HMGB1。(图10A)将来自NTHI感染的黄鼠中耳的OCT包埋的粘膜生物质的切片共标记HMGB1和DNABII蛋白, 用于免疫荧光显微镜检查。双链eDNA用DAPI标记(白色)。(图10B)将CF痰与抗生物膜处理剂(PBS, 1:10兔 α -1HF_{Ec}, 血清, 100U/ml Pulmozyme® (DNase), 1mM rHMGB1)在37℃孵育1小时, 并在0小时和2小时测量周围培养基的光密度。DNABII蛋白和HMGB1存在于体内呈扇形的粘膜生物膜中, 但不共定位在eDNA上。外源性HMGB1可以破坏CF痰中存在的生物膜。

详细说明

除非另有定义, 否则本文中使用的所有技术和科学的术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。尽管类似于或等同于本文描述的方法和材料的任何方法和材料都可以用于本公开的实践或测试中, 但是现在描述优选的方法、装置和材料。本文引用的所有技术和专利出版物均通过引用全文并入本文。本文中的任何内容均不得解释为承认本公开无权先于现有公开而早于该公开。

[0043] 除非另有说明, 否则本公开的实践将采用组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA的常规技术, 它们在本领域技术范围内。参见例如Sambrook and Russelleds. (2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 3rd edition; Ausubel et al. eds. (2007)Current Protocols in Molecular Biology系列; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.) 系列; MacPherson et al. (1991)PCR 1:A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995)PCR 2:A

Practical Approach; Harlow and Lane eds. (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th edition; Gait ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; U.S. Patent No. 4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins eds. (1984) Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); and Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology.

[0044] 所有数字值(包括范围),例如pH、温度、时间、浓度、以及分子质量,都是变化(+)或(-)0.1的增值的近似值,适当地或以 $\pm 15\%$ 、或 10% 或 5% 或 2% 变化。应当理解的是,尽管并非总是明确地说明,但所有数字值前面都有术语“约”。还应当理解的是,尽管并非总是明确说明,但本文所述的试剂仅是示例性的,并且其等效物在本领域中是已知的。

[0045] 如说明书和权利要求书中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该/所述”包括复数引用,除非上下文另外明确指出。例如,术语“一个多肽”包括多个多肽,包括其混合物。

[0046] 如本文所用,术语“包含”或“包括”旨在表示包括所列举的要素但不排除其他要素的组合物和方法。当用于定义组合物和方法时,“基本上由……组成”应表示排除对于所述目的而言对组合具有任何实质意义的其他元素。因此,基本上由本文所定义的元素组成的组合物将不会从分离和纯化方法以及药学上可接受的载体(例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等)中排除痕量污染物。“由……组成”是指排除其他成分和用于施用本文公开的组合物的实质性方法步骤的痕量元素。由这些过渡术语中的每一个限定的实施方案在本发明的范围内。

[0047] “生物膜”意指有时附着于可以是有机或无机的结构表面的微生物的有组织的群落,与它们分泌和/或释放的诸如DNA的聚合物一起。生物膜对微生物和抗菌剂具有很高的抵抗力。它们生活在牙龈组织、牙齿和修复体上,引起龋齿和牙周疾病(也称为牙周斑块病)。它们还会引起慢性中耳感染。生物膜也可以在牙科植入物、支架、导管和隐形眼镜的表面形成。它们在起搏器、心脏瓣膜替代物、人工关节和其他外科植入物上生长。疾病控制中心估计,超过65%的医院(医院获得性)感染是由生物膜引起的。真菌生物膜也经常污染医疗器械。它们会导致慢性阴道感染,并导致免疫系统低下的人危及生命的全身感染。生物膜也参与多种疾病。例如,囊性纤维化患者患有假单胞菌感染,通常导致抗生素耐药性生物膜形成。

[0048] “DNABII多肽或蛋白质”意指由DNA结合结构域组成并因此对微生物DNA具有特异性或一般性亲和力的DNA结合蛋白质或多肽。在一方面,它们在小沟中结合DNA。DNABII蛋白的非限制性实例是整合宿主因子(IHF)蛋白和来自大肠杆菌菌株U93的组蛋白样蛋白(HU)。可能与生物膜相关的其他DNA结合蛋白包括DPS (Genbank登录号:CAA49169)、H-NS (Genbank登录号:CAA47740)、Hfq (Genbank登录号:ACE63256)、CbpA (Genbank登录号:BAA03950)和CbpB (Genbank登录号:NP_418813)。

[0049] “IHF”蛋白的“整合宿主因子”是这样的细菌蛋白,其被噬菌体用于将其DNA掺入宿主细菌中。这些是在基因重组以及转录和翻译调控中起作用的DNA结合蛋白。它们还结合细胞外微生物DNA。编码大肠杆菌中IHF蛋白亚基的基因是himA (Genbank登录号:POA6X7.1)和himD (POA6Y1.1)基因。这些基因的同源物在其他生物中发现,与来自其他生物的这些基因相对应的肽可以在表1中找到。

[0050] “HMGB1”是高迁移率族盒(high mobility group box, HMGB)1蛋白,其据报道可结合并扭曲DNA的小沟,是干扰剂的一个例子。重组或分离的蛋白质和多肽可从Atgenglobal、ProSpecBio、Protein1和Abnova商购。

[0051] “A Box”多肽意指包含HMGB1蛋白的A box结构域的多肽。A Box多肽可以被突变或包含其他序列,例如接头序列、信号序列或分泌序列。非限制性实例显示在附图和序列表中。可以引入氨基酸K12、C23和C45中的一个或多个点突变。

[0052] “B Box”多肽意指包含HMGB1蛋白的B Box结构域的多肽。B Box多肽可以被突变或包含其他序列,例如接头序列、信号序列或分泌序列。可以引入氨基酸K114或C106中的点突变来影响DNA结合、炎性特性和抗生物膜活性。非限制性实例显示在附图和序列表中。

[0053] “AB Box”多肽意指包含融合在一起但缺少对应于全长野生型蛋白的氨基酸的HMGB1蛋白的A和B box结构域的多肽。AB Box多肽可以被突变或包含其他序列,例如接头序列、信号序列或分泌序列。可以引入本文所述氨基酸中的一个或多个点突变(例如,在氨基酸K12、C23、C45、C106和/或K114处),以影响DNA结合、炎性特性和抗生物膜活性。非限制性实例显示在附图和序列表中。

[0054] “HU”或“大肠杆菌U93株的组蛋白样蛋白”是指通常与大肠杆菌结合的一类异二聚体蛋白。已知HU蛋白会结合DNA汇合点。相关蛋白已从其他微生物中分离出来。Laine et al. (1980) Eur. J. Biochem 103 (3) 447-481报道了大肠杆菌HU的完整氨基酸序列。HU蛋白的抗体可从Abeam商购。

[0055] “接头”或“肽接头”是指与多肽序列的N端或C端连接的肽序列。一方面,接头的长度为约1至约20个氨基酸残基,或者为2至约10、约3至约5个氨基酸残基长。肽接头的例子是Gly-Pro-Ser-Leu-Lys-Leu或PPKGETKKKF。

[0056] “微生物DNA”意指来自产生生物膜的微生物的单链或双链DNA。

[0057] 如本文所用,术语“可检测的标记”意指直接或间接可检测的化合物或组合物直接或间接缀合至待检测的组合物,例如N-末端组氨酸标签(N-His)、磁活性同位素(例如¹¹⁵Sn、¹¹⁷Sn和¹¹⁹Sn)、非放射性同位素(例如¹³C和¹⁵N)、多核苷酸或蛋白质(例如抗体),以生成“标记的”成分。该术语还包括与多核苷酸缀合的序列,该序列将在插入序列表达时提供信号,例如绿色荧光蛋白(GFP)等。标记本身可以是可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记),或者在酶标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学变化。标签可适合于小规模检测,或更适合于高通量筛选。这样,合适的标记包括但不限于磁活性同位素、非放射性同位素、放射性同位素、荧光染料、化学发光化合物、染料和蛋白质(包括酶)。标记可以被简单地检测或可以被量化。被简单检测到的响应通常包括仅被确认存在的响应,而被量化的响应通常包括具有诸如强度、极化和/或其他性质的可量化(例如可数字报告)值的响应。在发光或荧光测定中,可直接使用与实际参与结合的测定组分相关的发光体或荧光团直接产生可检测的反应,或间接使用与另一(例如报道分子或指示剂)组分相关的

发光体或荧光团间接产生可检测的响应。产生信号的发光标记的例子包括但不限于生物发光和化学发光。可检测的发光响应通常包括发光信号的改变或出现。用于发光标记测定组分的合适方法和发光体是本领域已知的,例如在Haugland,Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (第六版) 中进行了描述。发光探针的实例包括但不限于水母发光蛋白和萤光素酶。

[0058] “基因递送载体”定义为可以将插入的多核苷酸携带到宿主细胞中的任何分子。基因传递载体的例子是:脂质体,胶束生物相容性聚合物,包括天然聚合物和合成聚合物;脂蛋白;多肽;多糖;脂多糖;人工病毒包膜;金属颗粒;以及细菌或病毒,例如杆状病毒、腺病毒和逆转录病毒、噬菌体、粘粒、质粒、真菌载体和本领域通常使用的其他重组载体,其已被描述用于在各种真核和原核宿主中表达,并可以用于基因治疗以及简单的蛋白质表达。

[0059] 可使用基因递送载体将本文公开的多核苷酸递送至细胞或组织。如本文所用,“基因递送”、“基因转移”、“转导”等是指将外源多核苷酸(有时称为“转基因”)引入宿主细胞中的术语,而与引入的方法无关。此类方法包括多种众所周知的技术,例如载体介导的基因转移(例如,通过病毒感染/转染,或各种其他基于蛋白质或基于脂质的基因递送复合物),以及促进“裸”多核苷酸递送的技术(例如电穿孔,“基因枪”递送以及用于引入多核苷酸的各种其他技术)。所引入的多核苷酸可以在宿主细胞中稳定或瞬时保持。稳定的保持通常要求引入的多核苷酸包含与宿主细胞相容的复制起点或整合到宿主细胞的复制子中,例如染色体外复制子(例如质粒)或核或线粒体染色体。如本领域已知和本文所述,已知许多载体能够介导基因向哺乳动物细胞的转移。

[0060] 如本文所用,术语“eDNA”是指被发现为病原性生物膜的组分的细胞外DNA。

[0061] 如本文所用,ESKAPE病原体包括粪肠球菌(*Enterococcus faecium*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和肠杆菌(*Enterobacter*)属。这些病原体是全世界医院感染的主要原因。

[0062] “质粒”是与染色体DNA分离的染色体外DNA分子,其能够独立于染色体DNA复制。在许多情况下,它是圆形的和双链的。质粒提供了在微生物种群内水平基因转移的机制,并且通常在给定的环境状态下提供选择优势。质粒可以携带在竞争性环境中对天然存在的抗生素具有抗性的基因,或者在相似情况下,产生的蛋白质可以充当毒素。

[0063] 基因工程中使用的“质粒”被称为“质粒载体”。许多质粒可用商业地于此类用途。将要复制的基因插入质粒的拷贝中,该质粒含有使细胞对特定抗生素具有抗性的基因和多个克隆位点(MCS或多接头),其是一个短区域,包含几个常用的限制性酶切位点,可轻松插入DNA片段在此位置。质粒的另一主要用途是制备大量蛋白质。在这种情况下,研究人员可以使细菌生长,该细菌含有带有目的基因的质粒。正如细菌产生赋予其抗生素抗性的蛋白质一样,它也可以被诱导从插入的基因中产生大量蛋白质。这是大量生产一种基因或其随后编码的蛋白质的廉价而简便的方法。

[0064] “酵母人工染色体”或“YAC”是指用于克隆大DNA片段(大于100kb且最大3000kb)的载体。它是人工构建的染色体,包含在酵母细胞中复制和保存所需的端粒、着丝粒和复制起点序列。使用最初的环状质粒构建,然后使用限制酶将它们线性化,然后DNA连接酶可以通过使用粘性末端在线性分子内添加目标序列或基因。酵母表达载体,例如YAC、YIp(酵母整

合质粒)和YEp(酵母游离质粒),非常有用,因为可以得到具有翻译后修饰的真核蛋白产物,因为酵母本身就是真核细胞,但是已经发现YAC是比BAC更不稳定,产生嵌合效应。

[0065] “病毒载体”定义为重组产生的病毒或病毒颗粒,其包含待体内、离体或体外递送至宿主细胞的多核苷酸。病毒载体的实例包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、 α 病毒载体等。基于传染性烟草花叶病毒(TMV)的载体可用于制造蛋白质,并且据报道在烟草叶中表达Griffithsin(O’Keefe et al. (2009) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106 (15): 6099-6104)。 α 病毒载体,例如基于Semliki Forest病毒的载体和基于Sindbis病毒的载体,也已被开发用于基因治疗和免疫治疗。参见Schlesinger & Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439以及Ying et al. (1999) Nat. Med. 5 (7):823-827。在逆转录病毒载体介导基因转移的方面,载体构建体是指包含逆转录病毒基因组或其一部分和治疗基因的多核苷酸。

[0066] 如本文所用,“逆转录病毒介导的基因转移”或“逆转录病毒转导”具有相同的含义,并且是指借助于病毒进入细胞并将其基因组整合到宿主细胞基因组中而将基因或核酸序列稳定地转移到宿主细胞中的过程。病毒可以通过其正常的感染机制进入宿主细胞,也可以对其进行修饰,使其与不同的宿主细胞表面受体或配体结合以进入细胞。如本文所用,逆转录病毒载体是指能够通过病毒或类病毒进入机制将外源核酸引入细胞的病毒颗粒。

[0067] 逆转录病毒以RNA形式携带其遗传信息;但是,一旦病毒感染细胞,RNA就会逆转录为DNA形式,其整合到被感染细胞的基因组DNA中。整合的DNA形式称为原病毒。

[0068] 在通过DNA病毒载体(例如腺病毒(Ad)或腺相关病毒(AAV))介导基因转移的方面,载体构建体是指包含病毒基因组或其一部分和转基因的多核苷酸。腺病毒(Ad)是表征相对较完善的同质病毒,包括超过50种血清型。参见例如PCT国际申请公开号W0 95/27071。Ad不需要整合到宿主细胞基因组中。还构建了重组Ad衍生载体,特别是减少重组可能性和产生野生型病毒的载体。参见PCT国际申请公开号W0 95/00655和W0 95/11984,野生型AAV具有整合到宿主细胞基因组中的高感染性和特异性。参见Hermonat & Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470和Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 3988-3996。

[0069] 既包含启动子又包含可将多核苷酸可操作地连接至的克隆位点的载体是本领域众所周知的。这样的载体能够在体外或体内转录RNA,并且可以从诸如Stratagene (La Jolla, CA) 和Promega Biotech (Madison, WI) 的来源商购获得。为了优化表达和/或体外转录,可能有必要去除、添加或改变克隆的5' 和/或3' 非翻译部分,以消除可能干扰的额外的、潜在的不适当的替代翻译起始密码子或在转录或翻译水平干扰或减少表达的其他序列。或者,可以在起始密码子的5' 处紧接着插入共有核糖体结合位点以增强表达。

[0070] 基因递送载体还包括DNA/脂质体复合物、胶束和靶向病毒蛋白-DNA复合物。同样包含靶向抗体或其片段的脂质体可用于本文公开的方法中。除了将多核苷酸递送至细胞或细胞群外,本文所述的蛋白质直接导入细胞或细胞群中还可以通过蛋白质转染的非限制性技术来完成,或者通过培养条件来增强表达和/或或促进本文公开的蛋白质的活性是其他非限制性技术。

[0071] “抑制、预防或破坏生物膜”旨在预防或治疗性减少生物膜的结构。一方面,术语“抑制、竞争或滴定”旨在减少作为微生物生物膜成分的DNA/蛋白质基质(例如如图6中所

示)的形成。一方面,预防被排除在治疗之外。

[0072] “弯曲的多核苷酸”意指这样的双链多核苷酸,其在一个链上包含小环,该环不与另一条链和任何多核苷酸配对,其中端对端距离减小到超过自然热波动,即弯曲超过天然B型双链DNA的持久长度150bp。在一些实施方案中,所述环的长度为1个碱基至约20个碱基,或替代地为2个碱基至约15个碱基长,或替代地为约3个碱基至约12个碱基长,或替代地为约4个碱基至约10个碱基长、或替代地具有约4、5、或6、或7、或8、9、或10个碱基。

[0073] 诊断或治疗的“对象”是细胞或动物,例如哺乳动物或人类。接受诊断或治疗的非人类动物是经受感染或动物模型的动物,例如猿猴、鼠类(例如大鼠、小鼠、黄鼠)、犬类(例如狗)、类脂动物(例如兔子)、家畜、运动动物和宠物。

[0074] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”可互换使用,并且在其最广义上是指两个或更多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或拟肽的化合物。亚基可以通过肽键连接。在另一个实施方案中,亚基可以通过其他键连接,例如酯、醚等。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且对可以构成蛋白质或肽序列的最大氨基酸数没有限制。如本文所用,术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括甘氨酸以及D和L旋光异构体、氨基酸类似物和拟肽。

[0075] 如本文关于核酸(例如DNA或RNA)所用,术语“分离的”或“重组的”是指分别与其他DNA或RNA分离的分子,其存在于大分子以及多肽的天然来源中。术语“分离的或重组的核酸”是指包括并非天然存在为片段并且不会以天然状态发现的核酸片段。术语“分离的”在本文中也用于指从其他细胞蛋白分离的多核苷酸、多肽和蛋白,并且意在包括纯化的和重组的多肽。在其他实施方案中,术语“分离的或重组的”是指与成分、细胞或其他分离,其中细胞、组织、多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段通常在自然界中是相关联的。例如,分离的细胞是与具有不同表型或基因型的组织或细胞分离的细胞。分离的多核苷酸与3'和5'连续核苷酸分离,在其天然或天然环境(例如在染色体上)通常与其是相关联的。对本领域技术人员显而易见的是,非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”即可将其与天然存在的对应物区分开。

[0076] 可以推断出,没有明确的叙述,除非另有说明,否则当本公开内容涉及多肽、蛋白质、多核苷酸或抗体时,其等效物或生物学等效物应在本公开内容的范围内。如本文所用,术语“其生物等效物”在指代参考蛋白、抗体、片段、多肽或核酸时旨在与“其等效物”同义,意指具有最小同源性而仍保持所需结构或功能的那些。除非本文具体叙述,否则预期本文提及的任何多核苷酸、多肽或蛋白质也包括其等效物。例如,等效物意指至少约70%的同源性或同一性,至少约80%的同源性或同一性,至少约85%,或替代地至少约90%,或替代地至少约95%,或98%的百分比同源性或同一性并表现出与参照蛋白、多肽或核酸基本相等的生物学活性。在另一方面,该术语意指在高严格性条件下与参考多核苷酸或其互补序列杂交的多核苷酸。

[0077] 多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域)与另一序列具有一定百分比(例如80%、85%、90%或95%)的“序列同一性”是指,当比对时,在比较两个序列时该百分比的碱基(或氨基酸)是相同的。可以使用本领域已知的软件程序来确定比对和同源性或序列同一性百分数,例如在Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al., eds.1987)Supplement 30,section 7.7.18,Table 7.7.1中描述的那些程序。优选地,使用默认参数进行比对。优选的比对程序是BLAST,使用默认参数。特别是,示例性的程序包括

BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;筛选=无;链=两个;截点=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序=HIGH SCORE;数据库=不重复的,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详情可以在以下网址找到:ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0078] “同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可以通过比较每个序列中的位置来确定,所述位置可以为了比较的目的而被比对。当比较序列中的一个位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则分子在该位置是同源的。序列之间的同源性程度是序列共享的匹配或同源位置数目的函数。“无关”或“非同源”序列与本公开的序列之一共享小于40%的同一性、或替代地小于25%的同一性。

[0079] “同源性”或“同一性”或“相似性”还可以指在严格条件下与参考多核苷酸或其互补序列杂交的两个核酸分子。

[0080] “杂交”是指一个或多个多核苷酸反应形成复合物的反应,该复合物通过核苷酸残基的碱基之间的氢键稳定。氢键可通过Watson-Crick碱基配对、Hoogsteen结合或以任何其他序列特异性方式发生。该复合物可以包括形成双链体结构的两条链、形成多链复合物的三条或更多条链、单一的自杂交链、或它们的任何组合。杂交反应可以构成更广泛过程中的一个步骤,例如PCR反应的启动、或核酶对多核苷酸的酶促切割。

[0081] 严格杂交条件的例子包括:约25℃至约37℃的孵育温度;约6×SSC至约10×SSC的杂交缓冲液浓度;约0%至约25%的甲酰胺浓度;以及约4×SSC至约8×SSC的洗涤溶液。中度杂交条件的例子包括:约40℃至约50℃的孵育温度;约9×SSC至约2×SSC的缓冲液浓度;约30%至约50%的甲酰胺浓度;以及约5×SSC至约2×SSC的洗涤溶液。高严格杂交条件的例子包括:约55℃至约68℃的孵育温度;约1×SSC至约0.1×SSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约1×SSC至约0.1×SSC的洗涤溶液、或去离子水。一般来说,杂交孵育时间为5分钟至24小时,具有1、2或更多个洗涤步骤,并且洗涤孵育时间为约1、2或15分钟。SSC是0.15M NaCl和15mM柠檬酸缓冲液。应该理解的是,可以采用使用其他缓冲系统的SSC的等效物。

[0082] 如本文所用,术语“治疗”等在本文中用于意指获得期望的药理和/或生理作用。就完全或部分预防疾病或其迹象或症状而言,该作用可以是预防性的,和/或对于疾病的部分或完全治愈和/或归因于该疾病的不利影响而言,该作用可以是治疗性的。在一方面,“治疗”不包括预防。

[0083] “预防”旨在预防易患疾病或效应的系统或对象体内或体外的疾病或效应。这样的例子是防止在被已知会产生生物膜的微生物感染的系统中形成生物膜。

[0084] “药学上可接受的载体”是指可以在本文公开的组合物中使用的任何稀释剂、赋形剂或载体。药学上可接受的载体包括:离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如人血清白蛋白)、缓冲物质(例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾)、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质(例如硫酸鱼精蛋白)、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。合适的药物载体在该领域的标准参考书Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company中有描述。可以根据预期的给药形式,即口服片剂、胶囊剂、酏剂、糖浆剂等来选择它们,并

且与常规药学实践一致。

[0085] “施用/给药”可以在整个治疗过程中以一剂连续或间歇地进行。确定最有效的给药方式和剂量的方法是本领域技术人员已知的,并且将根据用于治疗的组合、治疗的目的、所治疗的靶细胞和所治疗的对象而变化。可以通过治疗医师选择剂量水平和方式进行单次或多次给药。合适的剂型和施用试剂的方法是本领域已知的。也可以确定给药途径,并且确定最有效给药途径的方法是本领域技术人员已知的,并且将根据用于治疗的组合、治疗目的、被治疗的对象的健康状况或疾病阶段、以及靶细胞或组织而变化。施用途径的非限制性实例包括口服施用、鼻腔施用、注射和局部施用。

[0086] 术语“有效量”是指足以实现期望效果的量。在治疗或预防应用的情况下,有效量将取决于所讨论病症的类型和严重性以及个体对象的特征,例如总体健康、年龄、性别、体重和对药物组合物的耐受性。在免疫原性组合物的情况下,在一些实施方案中,有效量是足以引起针对病原体的保护性应答的量。在其他实施方案中,免疫原性组合物的有效量是足以导致产生针对抗原的抗体的量。在一些实施方案中,有效量是赋予有需要的对象被动免疫所需的量。关于免疫原性组合物,在一些实施方案中,除了上述因素之外,有效量将取决于预期用途、特定抗原性化合物的免疫原性程度和对象免疫系统的健康/应答性。技术人员将能够根据这些和其他因素确定适当的量。

[0087] 在体外应用的情况下,在一些实施方案中,有效量将取决于所讨论的应用的大小和性质。它还将取决于体外靶标的性质和敏感性以及所使用的方法。本领域技术人员将能够基于这些和其他考虑因素确定有效量。根据实施方案,有效量可以包括组合物的一次或多次施用。

[0088] 所述试剂和组合物可通过按照常规方法(例如药物组合物中的活性成分)给药而用于药物的制造以及用于治疗人和其他动物。

[0089] 本发明的试剂/药剂可以通过任何合适的施用途径施用以进行治疗。还应当理解,最佳途径将随着对象的状况和年龄以及所治疗的疾病而变化。

[0090] 固相支持物的实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩和磁铁矿。载体的性质可以在某种程度上可溶或不可溶。载体材料实际上可以具有任何可能的结构构型,只要偶联的分子能够结合多核苷酸、多肽或抗体即可。因此,载体结构可以是球形的,例如珠状的,或者是圆柱形的,例如在试管的内表面或杆的外表面。替代地,表面可以是平坦的,诸如片、测试条等,或者替代地聚苯乙烯珠。本领域技术人员将知道许多用于结合抗体或抗原的其他合适的载体,或者将能够通过使用常规实验来确定它们。

[0091] 如本文所用,术语“抗体”包括完整的抗体及其任何抗原结合片段或其单链。因此,术语“抗体”包括包含至少一部分免疫球蛋白分子的任何蛋白质或肽分子。这样的例子包括但不限于重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区(CDR)、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架(FR)区或其任何部分,结合蛋白、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体和包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合蛋白的至少一部分。

[0092] 抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体,并且可以从任何合适的生物学来源(例如鼠、大鼠、绵羊和犬)中分离。

[0093] “免疫应答”广义上是指淋巴细胞对异物的抗原特异性应答。可以引起免疫反应的

任何物质都被称为具有“免疫原性”，被称为“免疫原”。所有的免疫原都是抗原，但是，并非所有的抗原都是免疫原性的。本文公开的免疫应答可以是体液的（通过抗体活性）或细胞介导的（通过T细胞激活）。

[0094] 如本文所用，术语“在对象中诱导免疫应答”是本领域众所周知的术语，并且是指相对于在将抗原（或表位）引入对象之前的免疫应答（如有），在将抗原（或表位）引入对象之后，可以检测或测量到对抗原（或表位）的免疫应答增加至少约2倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约100倍、至少约500倍或至少约1000倍或更多。对抗原（或表位）的免疫应答包括但不限于抗原特异性（或表位特异性）抗体的产生，以及在其表面表达与抗原（或表位）特异性结合的分子的免疫细胞的产生。确定是否已经诱导了针对给定抗原（或表位）的免疫应答的方法是本领域众所周知的。例如，可以使用本领域已知的多种免疫测定中的任何一种来检测抗原特异性抗体，这些免疫测定包括但不限于ELISA，其中例如样品中的抗体与固定的抗原（或表位）结合用可检测标记的二抗（例如酶标记的小鼠抗人Ig抗体）检测。

[0095] 术语“调节免疫应答”包括诱导（增加、引发）免疫应答；并减少（抑制）免疫反应。免疫调节方法（或方案）是一种调节对象免疫应答的方法。

[0096] “HMG结构域”或“高迁移率族（HMG）box结构域”是指参与结合DNA的氨基酸序列（Stros et al., Cell Mol Life Sci. 64 (19-20) : 2590-606 (2007)）。在一个实施方案中，HMG-box结构域的结构由不规则阵列中的三个螺旋组成。在另一个实施方案中，HMG-box结构域使蛋白质能够以高亲和力结合非B型DNA构象（扭结或解绕）。HMG-box域位于高迁移率族蛋白中，这些蛋白参与DNA依赖性过程的调控，例如转录、复制和DNA修复，所有这些都需要改变染色质的构象（Thomas (2001) Biochem. Soc. Trans. 29 (Pt 4) : 395-401）。

[0097] 用于执行本发明的方式
多肽组合物

本文提供了包含本文所述的HMG-box结构域截短体和/或突变体的多肽、以及蛋白质、包含一个或多个HMG-box结构域、截短体、突变体的这些蛋白的片段，或具有公开的氨基酸取代的这些蛋白或片段的等效物。

[0098] 因此，在一个方面，本发明提供了一种分离的A Box多肽，其任选地包含一个或多个选自K12、C23和C45的氨基酸突变（例如，天然的K或C被修饰为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸）或其等效物，所述等效物包含一个或多个选自K12、C23和C45的氨基酸突变（例如，天然的K或C被修饰为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸），或基本上由其组成，或由其组成。一方面，该突变是C45S突变。A Box多肽可以进一步包含位于一个或两个末端的接头或肽序列。肽接头的一个实例是PPKGETKKKF。

[0099] 当重组产生时，A Box多肽可以被部分或完全乙酰化、氧化或磷酸化，使用本领域已知的方法，例如Olia AS, et al. (2015) ACS chemical biology. 10 (9) : 2034-47. doi: 10.1021/acscchembio.5b00342, PubMed PMID: 26083674; PubMed Central PMCID: PMC4610810; Ugrinova I, et al. (2012) Molecular Biology Reports, 2012; 39 (11) : 9947-53. Epub 2012/06/29. doi: 10.1007/s11033-012-1863-x. PubMed PMID: 22740141; 以及 Ito T, et al. (2007) JTH, 5 (1) : 109-16. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02255.x. PubMed PMID: 17239166。一方面，A Box多肽包含野生型HMGB1多肽的氨基酸1至70，其具有前述突

变,或基本上由其组成,或由其组成。

[0100] A Box多肽的实例包含以下序列,或基本上由其组成,或由其组成:MGKGDPKKPR RKMSYAFFV QTCREEHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK TMSAKEKGKF EDMAKADKAR YEREMKTYIP PKGETKKKF(小鼠)

MGKGDPKKPR GKMSYAFFV QTCREEHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK TMSAKEKGKF EDMAKADKAR YEREMKTYIP PKGETKKKF(人)。

[0101] 如本文所用,多肽的等效物是指与参考多肽具有少约70%、或至少约75%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%的同一性的序列,其在一个方面中,保留了突变的氨基酸。在一些方面,多肽的等效物保留了多肽的预期功能和/或结构特征,例如含有HMG-box结构域。一方面,等效多肽包括与HMG-box结构域具有至少约70%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%的同一性的结构域,其在一个方面保留了突变的氨基酸。在一些方面,这样的等效结构域保留了HMB-box结构域的功能和/或结构特征,例如,与HMB-box结合靶标的结合。一方面,等效多肽由可在严格条件下与编码HMB-box结构域多肽的多核苷酸杂交的多核苷酸编码。

[0102] 本文还提供了分离的B Box多肽,其任选地包含在氨基酸C106或K114处的突变(例如,天然的半胱氨酸变为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸)或其等效物,该等效物包含在氨基酸C106或K114处的突变(例如,天然的半胱氨酸变为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸),或基本上由其组成,或由其组成。一方面,B Box多肽包含野生型HMGB1 B Box多肽的氨基酸约80至约176、或约88至约164、或约89至约162、或约80至约164,其具有前述的突变,或基本上由其组成,或由其组成。用于修饰野生型HMGB1 B Box多肽的其他位置在图1C中示出。B Box多肽的实例包含以下序列,或基本上由其组成,或由其组成:KDPNAPKRPPSAFFLCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKK LGEMWNNTAADDKQPYEKKAELKLEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVV(小鼠)

KDPNAPKRPPSAFFLCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAELKLEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVV(人)。

[0103] B Box多肽可以进一步包含位于一个或两个末端的接头或肽序列。肽接头的实例是PPKGETKKKF。当重组产生时,公开的B Box多肽可以被部分或完全乙酰化、氧化或磷酸化,其使用本领域已知的方法,例如Olia AS,et al. (2015) ACS chemical biology.10(9):2034-47.doi:10.1021/acscchembio.5b00342,PubMed PMID:26083674;PubMed Central PMCID:PMC4610810;Ugrinova I,et al. (2012) Molecular Biology Reports,2012;39(11):9947-53.Epub2012/06/29.doi:10.1007/s11033-012-1863-x.PubMed PMID:22740141;以及Ito T,et al. (2007) JTH,5(1):109-16.doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02255.x.PubMed PMID:17239166。

[0104] 如本文所用,多肽的等效物是指与参考多肽具有少约70%、或至少约75%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%的同一性的序列,其在一个方面中,保留了突变的氨基酸。在一些方面,多肽的等效物保留了多肽的预期功能和/或结构特征,例如含有HMG-box结构域。一方面,等效多肽包括与HMG-box结构域具有至少约70%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少

约98%、或至少约99%的同一性的结构域,其在一个方面保留了突变的氨基酸。在一些方面,这样的等效结构域保留了HMB-box结构域的功能和/或结构特征,例如,与HMB-box结合靶标的结合以及任选地失去其促炎反应。一方面,等效多肽由可在严格条件下与编码HMB-box结构域多肽的多核苷酸杂交的多核苷酸编码。

[0105] 在另一方面,本文提供了分离的AB Box多肽,其任选地包含一个或多个选自K12、C23、C45以及C106或K114的氨基酸突变(例如,天然的K或C被修饰为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸)或其等效物,该等效物包含一个或多个选自K12、C23和C45以及C106或K114的氨基酸突变(例如,天然的K或C被修饰为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸),或基本上由其组成,或由其组成。一方面,该突变是C45S突变。在另一方面,该多肽包含在氨基酸C106处的突变(例如天然的半胱氨酸变为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸)或其等效物,该等效物包含一个或多个选自K12、C23、C45的氨基酸突变和在氨基酸C106处的突变(例如天然的半胱氨酸变为选自丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苏氨酸的氨基酸)。一方面,AB Box多肽包含C45S和C106S突变并且等效物保留了这些突变。一方面,AB Box多肽包含野生型HMGB1多肽的氨基酸1至176、或1至162、或1至164,其具有前述突变,或基本上由其组成,或由其组成。

[0106] 在另一个方面,AB Box多肽可以进一步包含连接A Box多肽和B Box多肽的接头多肽,并且在一方面,还包含连接B Box和C Box多肽的第二接头。当重组产生时,AB或A、B和C Box多肽可以被部分或完全乙酰化、氧化或磷酸化。肽接头的实例是PPKGETKKKF。一方面,分离的突变的HMGB1多肽在A和/或B Box结构域中具有如本文所述的1个或更多个氨基酸取代,其可以任选地被部分或完全乙酰化、氧化或磷酸化,其使用本领域已知的方法,例如Oliva AS, et al. (2015) ACS chemical biology. 10 (9): 2034-47. doi:10.1021/acschembio.5b00342, PubMed PMID: 26083674; PubMed Central PMCID: PMC4610810; Ugrinova I, et al. (2012) Molecular Biology Reports, 2012; 39 (11): 9947-53. Epub 2012/06/29. doi:10.1007/s11033-012-1863-x. PubMed PMID: 22740141; 以及 Ito T, et al. (2007) JTH, 5 (1): 109-16. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02255.x. PubMed PMID: 17239166。

[0107] AB Box多肽的实例包含以下序列,其具有前述突变,或基本上由其组成,或由其组成:

```
MGKGDPKKPRRKMSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGK
FEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSAFFLCSEYRPKIKGEHPGL
SIGDVAKKLGMWNNTAADDKQPYEKKAELKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVV (小鼠)
MGKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGK
FEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSAFFLCSEYRPKIKGEHPGL
SIGDVAKKLGMWNNTAADDKQPYEKKAELKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVV (人)。
```

[0108] 如本文所用,多肽的等效物是指与参考多肽具有少约70%、或至少约75%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%的同一性的序列,其在一个方面中,保留了突变的氨基酸。在一些方面,多肽的等效物保留了多肽的预期功能和/或结构特征,例如含有HMG-box结构域。一方面,等效多肽包括与HMG-box结

构域具有至少约70%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%的同一性的结构域,其在一个方面保留了突变的氨基酸。在一些方面,这样的等效结构域保留了HMB-box结构域的功能和/或结构特征,例如,与HMB-box结合靶标的结合但不诱导促炎反应。一方面,等效多肽由可在严格条件下与编码HMB-box结构域多肽的多核苷酸杂交的多核苷酸编码。

[0109] 在另一方面,分离的AB Box多肽进一步包含连接A Box多肽和B Box多肽的接头多肽。

[0110] 还提供了包含A、B和C结构域的分离的HMGB1多肽,其中该多肽包括一个或多个选自K12、C23、C45、C106或K114的氨基酸突变、或其等效物,该等效物包括一个或多个选自K12、C23、C45、C106或K114的氨基酸突变,或基本上由其组成,或由其组成。如本文所用,多肽的等效物是指与参考多肽具有少约70%、或至少约75%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%的同一性的序列,其在一个方面中,保留了突变的氨基酸。在一些方面,多肽的等效物保留了多肽的预期功能和/或结构特征,例如含有HMG-box结构域但不诱导促炎反应。一方面,等效多肽包括与HMG-box结构域具有至少约70%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%的同一性的结构域,其在一个方面保留了突变的氨基酸。在一些方面,这样的等效结构域保留了HMB-box结构域的功能和/或结构特征,例如,与HMB-box结合靶标的结合但不诱导促炎反应。一方面,等效多肽由可在严格条件下与编码HMB-box结构域多肽的多核苷酸杂交的多核苷酸编码。

[0111] 在另一方面,分离的AB Box多肽进一步包含连接A Box多肽和B Box多肽的接头多肽,以及连接B Box和C Box多肽的第二接头。肽接头的实例是PPKGETKKKF。

[0112] 多肽可以被可检测地标记和/或与载体(例如药学上可接受的载体)组合。

[0113] 抗体及其衍生物

本公开还提供了结合和/或特异性识别和结合分离的多肽的抗体,用于本文公开的方法。抗体可以是本文所述的各种抗体中的任何一种,这样的非限制性实例包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体、贴面化抗体(veneered antibody)、双抗体、人源化抗体、抗体衍生物、重组人源化抗体或其各自的衍生物或片段。在一方面,该片段包含抗体的CDR,或基本上由其组成,或由其组成。在一方面,抗体被可检测地标记或进一步包含与其偶联的可检测标记。还提供了产生本文公开的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。本文进一步提供了组合物,其包含一种或多种上述实施方案,或基本上由其组成,或由其组成。还提供了编码抗体和片段的氨基酸序列的多核苷酸,以及产生重组或化学合成抗体多肽及其片段的方法。抗体多肽可以在真核或原核细胞中产生,或通过本领域已知的和本文描述的其他方法产生。

[0114] 抗体可以使用本领域已知的常规技术产生,并且在文献中有充分描述。存在几种产生多克隆抗体的方法。例如,多克隆抗体通常通过免疫合适的哺乳动物来产生,例如但不限于鸡、山羊、豚鼠、仓鼠、马、小鼠、大鼠和兔子。将抗原注射到哺乳动物中,诱导B淋巴细胞产生对该抗原具有特异性的免疫球蛋白。免疫球蛋白可以从哺乳动物的血清中纯化。

[0115] 单克隆抗体可以使用本领域已知的和文献中充分描述的常规杂交瘤技术来产生。例如,通过以下来产生杂交瘤:融合合适的永生细胞系(例如,骨髓瘤细胞系,例如但不限于

Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L.5、P3X63Ag8.653、Sp2、SA3、Sp2MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U397、MIA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 313、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A、CHO、PerC.6、YB2/0)等、或杂种骨髓瘤、其融合产物、或衍生自其的任何细胞或融合细胞、或本领域已知的任何其他合适的细胞系(参见以下网址的技术,例如atcc.org,lifetech.com,最新访问时间为2007年11月26日),其具有产生抗体的细胞,例如但不限于:分离的或克隆的脾脏、外周血、淋巴、扁桃体、或其他免疫或包含B细胞的细胞、或表达重链或轻链恒定或可变或构架或CDR序列(内源或异源核酸)(重组或内源)的任何其他细胞、病毒、细菌、藻类、原核、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼、哺乳动物、啮齿动物、马、绵羊、山羊、绵羊、灵长类动物、真核生物、基因组DNA、cDNA、rDNA、线粒体DNA或RNA、叶绿体DNA或RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链的、杂交的等或其任何组合。产生抗体的细胞也可以从已经用目的抗原免疫然后筛选目的活性的人或其他合适动物的外周血或脾或淋巴结中获得。任何其他合适的宿主细胞也可以用于表达编码本发明的抗体、其指定片段或变体的异源或内源核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可以使用选择性培养条件或其他合适的已知方法分离,并通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法克隆。

[0116] 可以使用产生或分离具有必要特异性的抗体的其他合适方法,包括但不限于使用本领域已知的方法从肽或蛋白质文库中选择重组抗体的方法(例如但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、cDNA等展示文库;例如可从各种商业供应商获得的,例如MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.)、BioInvent (Lund, Sweden)、Affitech (Oslo, Norway))。专利文献中描述了本领域已知的方法,其中一些包括美国专利号4,704,692、5,723,323、5,763,192、5,814,476、5,817,483、5,824,514和5,976,862。替代方法依赖于如本领域已知的和/或如本文所述能够产生人类抗体库的转基因动物(例如SCID小鼠, Nguyen et al. (1977) Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al. (1996) Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118; Eren et al. (1998) Mamma 93:154-161)的免疫。此类技术包括但不限于:核糖体展示 Wanes et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937-4942; Hanes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14130-14135; 单细胞抗体产生技术(例如,选择的淋巴细胞抗体方法(“SLAM”) (美国专利号5,627,052; Wen et al. (1987) J. Immunol. 17:887-892; Babcook et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848); 凝胶微滴和流式细胞术 (Powell et al. (1990) Biotechnol. 8:333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass.); Gray et al. (1995) J. Imm. Meth. 182:155-163; 以及 Kenny et al. (1995) Bio. Technol. 13:787-790); B细胞选择 (Steenbakkers et al. (1994) Molec. Biol. Reports 19:125-134)。

[0117] 本公开的抗体衍生物也可以通过以下方法来制备:将编码本文公开的抗体的多核苷酸递送至合适的宿主以提供转基因动物或哺乳动物(例如山羊、牛、马、绵羊等在),其在奶中产生这种抗体。这些方法是本领域已知的,并且例如描述于美国专利号5,827,690、5,849,992、4,873,316、5,849,992、5,994,616、5,565,362和5,304,489。

[0118] 术语“抗体衍生物”包括对抗体或片段的线性多肽序列的翻译后修饰。例如,美国专利号6,602,684B1描述了一种用于产生修饰的乙二醇形式的抗体的方法,包括完整的抗体分子、抗体片段或融合蛋白,其包含与免疫球蛋白的Fc区等效的区域,具有增强的铁介导的细胞毒性,并因此产生糖蛋白。

[0119] 本文公开的抗体还包括这样的衍生物,其通过任何类型的分子共价附接至抗体而

修饰,使得共价附接不会阻止抗体产生抗独特型应答。抗体衍生物包括但不限于已经通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其他蛋白质的连接等修饰的抗体。此外,衍生物可包含一种或多种非经典氨基酸。

[0120] 抗体衍生物也可以通过以下方法来制备:递送本文公开的多核苷酸以提供在植物部分中或在从中培养的细胞中产生此类抗体、特定部分或变体的转基因植物和培养的植物细胞(例如但不限于烟草、玉米和浮萍)。例如Cramer et al. (1999) Curr.Top.Microbol.Immunol.240:95-118和其中引用的参考文献描述了表达大量重组蛋白的转基因烟草叶的生产,例如使用诱导型启动子。转基因玉米已用于以商业生产水平表达哺乳动物蛋白,其生物学活性等同于其他重组系统中产生的或从天然来源纯化的生物活性。参见例如Hood et al. (1999) Adv.Exp.Med.Biol.464:127-147及其中引用的参考文献。还已经从包括抗体片段的转基因植物种子中大量生产抗体衍生物,例如单链抗体(scFv),包括烟草种子和马铃薯块茎。参见,例如Conrad et al. (1998) Plant Mol.Biol.38:101-109及其中引用的参考文献。因此,根据已知方法,也可以使用转基因植物产生抗体。

[0121] 抗体衍生物也可以通过以下方法来产生:例如添加外源序列以修饰免疫原性或减少、增强或修饰结合、亲和力、开启速率、关闭速率、活动性、特异性、半衰期或任何其他合适的特性。通常,部分或全部非人或人CDR序列得以保留,而可变区和恒定区的非人序列被人或其他氨基酸或来自其他同种型的可变区或恒定区代替。

[0122] 通常,CDR残基直接且最实质地参与影响抗原结合。可以使用任何已知方法来进行抗体的人源化或工程改造,例如但不限于美国专利号5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539和4,816,567中所述的方法。

[0123] 可基于使用标准分子生物学技术制备的参考单克隆抗体的序列来制备本公开的嵌合、人源化或灵长类化的抗体。可以从感兴趣的杂交瘤中获得编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA,并使用标准分子生物学技术对其进行改造,使其包含非参考(例如人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以使用本领域已知的方法(美国专利号4,816,567)将鼠类可变区连接至人恒定区。为了产生人源化抗体,可以使用本领域已知的方法(美国专利号5,225,539和美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370)将鼠CDR区插入人框架。类似地,为了产生灵长类化的抗体,可以使用本领域已知的方法(WO 93/02108和WO 99/55369)将鼠的CDR区插入灵长类框架中。

[0124] 制备部分至完全人抗体的技术是本领域已知的,并且可以使用任何此类技术。根据一个实施方案,在转基因小鼠中制备完全人抗体序列,该转基因小鼠已被工程化以表达人重链和轻链抗体基因。已经制备了可以产生不同类别的抗体的这种转基因小鼠的多种菌株。可以融合产生所需抗体的转基因小鼠的B细胞,以制备杂交瘤细胞系,以连续产生所需抗体。(参见例如,Russel et al. (2000) Infection and Immunity April 2000:1820-1826; Gallo et al. (2000) European J.of Immun.30:534-540; Green (1999) J.of Immun.Methods 231:11-23; Yang et al. (1999A) J.of Leukocyte Biology 66:401-410; Yang (1999B) Cancer Research 59 (6):1236-1243; Jakobovits (1998) Advanced Drug Reviews 31:33-42; Green and Jakobovits (1998) J.Exp.Med.188 (3):483-495;

Jakobovits(1998)Exp.Opin.Invest.Drugs 7(4):607-614;Tsuda et al.(1997)Genomics 42:413-421;Sherman-Gold(1997)Genetic Engineering News 17(14);Mendez et al.(1997)Nature Genetics 15:146-156;Jakobovits(1996)Weir's Handbook of Experimental Immunology,The Integrated Immune System Vol.IV,194.1-194.7;Jakobovits(1995)Current Opinion in Biotechnology 6:561-566;Mendez et al.(1995)Genomics 26:294-307;Jakobovits(1994)Current Biology 4(8):761-763;Arbones et al.(1994)Immunity 1(4):247-260;Jakobovits(1993)Nature 362(6417):255-258;Jakobovits et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90(6):2551-2555;以及美国专利号6,075,181)。

[0125] 本文公开的抗体也可以被修饰以产生嵌合抗体。嵌合抗体是指抗体重链和轻链的各个域都被一种以上的DNA编码的抗体。参见例如美国专利号4,816,567。

[0126] 替代地,本文公开的抗体也可以被修饰以产生贴面化抗体。贴面化抗体是这样的抗体,其中一个物种的抗体的外部氨基酸残基被明智地替换或“贴面”为第二物种的抗体,以使第一个物种的抗体在第二个物种中不具有免疫原性,从而降低免疫原性抗体。由于蛋白质的抗原性主要取决于其表面的性质,因此可以通过替换暴露的残基来降低抗体的免疫原性,所述残基不同于另一种哺乳动物物种抗体中通常发现的残基。明智地替换外部残留物应该对内部域或域间接触几乎没有或没有影响。因此,由于限于可变区框架残基的改变,配体结合性质应不受影响。该过程被称为“贴面”,因为仅抗体的外表面或皮肤被改变,支持残基保持不受干扰。

[0127] “贴面”的过程利用了人类抗体可变域的可用序列数据,其由Kabat et al.(1987)Sequences of Proteins of Immunological interest,4th ed.,Bethesda,Md.,National Institutes of Health编译(此数据库的更新),以及其他可访问的美国和外国数据库(核酸和蛋白质)。用于产生贴面化抗体的方法的非限制性实例包括EP 519596、美国专利号6,797,492,并且描述于Padlan et al.(1991)Mol.Immunol.28(4-5):489-498。

[0128] 术语“抗体衍生物”还包括“双抗体”,其是具有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中片段在同一多肽链中包含连接至轻链可变域(VL)的重链可变域(VH)。(参见例如EP 404,097、W0 93/11161、以及Hollinger et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448)。通过使用太短以至于不允许同一条链上两个结构域之间配对的接头,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。(还参见Chen等人的美国专利号6,632,926,其公开了这样的抗体变体,其具有一个或多个氨基酸插入亲本抗体的高变区中,并且对靶抗原的结合亲和力比亲本抗体对抗原的结合亲和力强至少约两倍)。

[0129] 术语“抗体衍生物”还包括工程化的抗体分子、片段和单个结构域,例如scFv、dAb、纳米抗体、微型抗体、单一体和Affibodies&Hudson(2005)Nature Biotech 23(9):1126-36、美国专利申请公开号2006/0211088、PCT国际申请公开号W0 2007/059782、美国专利5,831,012。

[0130] 术语“抗体衍生物”还包括“线性抗体”。制备线性抗体的方法在本领域中是已知的,并在Zapata et al.(1995)Protein Eng.8(10):1057-1062中描述。简而言之,这些抗体包含一对串联的Ed区段($V_H-C_H1-VH-C_H1$),其形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0131] 可通过已知方法从重组细胞培养物中回收和纯化本文公开的抗体,所述方法包括但不限于蛋白A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。高效液相色谱法(“HPLC”)也可用于纯化。

[0132] 本公开内容的抗体包括天然纯化的产物、化学合成程序的产物以及通过重组技术从真核宿主(包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)或可替代地从如上所述的原核生物宿主产生的产物。许多抗体生产系统描述于Birch&Radner (2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:671-685。

[0133] 如果被测试的抗体与蛋白质或多肽结合,则被测试的抗体和本公开内容提供的抗体是等效的。还可以通过确定被测试的抗体是否阻止本文公开的抗体结合与该抗体正常反应的蛋白质或多肽,而无需过多实验就可以确定抗体是否具有与本文公开的抗体相同的特异性。如果所测试的抗体与本文公开的抗体竞争,如本文公开的单克隆抗体的结合减少所显示,则这两种抗体很可能与相同或密切相关的表位结合。或者,可以将本文公开的抗体与通常与之反应的蛋白质预孵育,并确定所测试的抗体结合抗原的能力是否受到抑制。如果所测试的抗体被抑制,则极有可能具有与本文公开的抗体相同或密切相关的表位特异性。

[0134] 术语“抗体”还意图包括所有免疫球蛋白同种型和亚类的抗体。单克隆抗体的特定同种型可以通过从初始融合中选择直接制备,或者通过使用sib选择技术来使用Steplewski et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8653 or Spira et al. (1984) *J. Immunol. Methods* 74:307中描述的方法分离类别转换变体,以从分泌不同同种型单克隆抗体的亲本杂交瘤中进行间接制备。或者,可以使用重组DNA技术。

[0135] 具有本文所述单克隆抗体特异性的其他单克隆抗体的分离也可以由本领域普通技术人员通过产生抗独特型抗体来完成。Herlyn et al. (1986) *Science* 232:100。抗独特型抗体是识别存在于感兴趣的单克隆抗体上的独特决定簇的抗体。

[0136] 在本文公开的一些方面,对抗体进行可检测或治疗性标记是有用的。合适的标签如上所述。偶联针对这些试剂的抗体的方法是本领域已知的。仅出于举例说明的目的,可以用可检测的部分(例如放射性原子、发色团、荧光团)等标记抗体。这样的标记抗体可以用于体内或分离的测试样品中的诊断技术。

[0137] 抗体与低分子量半抗原的偶联可以增加测定中抗体的敏感性。然后可以通过第二反应特异性地检测半抗原。例如,通常使用半抗原,例如生物素(其可与抗生物素蛋白反应)或二硝基苯酚、吡哆醛和荧光素(其可与特定的抗半抗原抗体反应)。参见上文的Harlow和Lane (1988)。

[0138] 本发明的抗体的可变区可以通过突变VH和/或VL CDR 1、CDR 2和/或CDR 3区域内的氨基酸残基来修饰以改善抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力)。可以通过定点诱变或PCR介导的诱变引入突变,并且可以在适当的体外或体内测定中评估对抗体结合或其他目的功能特性的影响。在某些实施方案中,引入保守修饰并且通常改变CDR区内不超过1、2、3、4或5个残基。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。

[0139] 可以对抗体进行框架修饰以降低免疫原性,例如,通过将一个或多个框架残基“突变回”相应的种系序列。

[0140] 另外,本文公开的抗体可以被工程化以包括Fc区内的修饰,以改变抗体的一种或

多种功能特性,例如血清半定量、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此类修饰包括但不限于铰链区中半胱氨酸残基的数目的改变,以促进轻链和重链的组装或增加或降低抗体的稳定性(美国专利号5,677,425),或者Fc铰链区中的氨基酸突变以降低抗体的生物学半衰期(美国专利号6,165,745)。

[0141] 另外,本文公开的抗体可以被化学修饰。可以例如通过修饰抗体序列内一个或多个糖基化位点以增加抗体对抗原的亲合力来改变抗体的糖基化(美国专利号5,714,350和6,350,861)。或者,为了增加抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,可以通过在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来获得具有减少的岩藻糖基残基量的次岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分GlcNAc结构的抗体。(Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-180)。

[0142] 本文公开的抗体可以被聚乙二醇化以增加生物学半衰期,其通过在一个或多个PEG基团变得连接至抗体或抗体片段的条件下使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)或PEG的反应性酯或醛衍生物反应。可以通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应来进行抗体聚乙二醇化。如本文所用,术语“聚乙二醇”旨在涵盖已用于衍生化其他蛋白质的任何形式的PEG,例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。待聚乙二醇化的抗体可以是无糖基化的抗体。聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的,并且可以应用于本文公开的抗体(EP 0154316和EP 0401384)。

[0143] 另外,可以通过将抗体的抗原结合区与血清蛋白(例如人血清白蛋白)缀合或融合来化学修饰抗体,以增加所得分子的半衰期。例如在EP 0322094和EP 0486525中描述了这种方法。

[0144] 本公开的抗体或其片段可以与诊断剂缀合并可以诊断地用于例如监测疾病的发展或进程并确定给定治疗方案的功效。诊断剂的实例包括酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性材料、使用各种正电子发射断层摄影术的正电子发射金属、以及非放射性顺磁性金属离子。可以使用本领域已知的技术,将可检测物质直接偶联或偶联至抗体或其片段,或通过接头间接偶联或偶联。合适的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶。合适的修复基团复合物的例子包括链霉素亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素。合适的荧光材料的例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白。发光材料的实例包括鲁米诺。生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白。合适的放射性物质的例子包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、铟111、镱171、铽212、铽213、砷211、铜62、铜64、铜67、钇90、碘125、碘131、磷32、磷33、钐47、银111、镓67、镱142、钐153、铽161、镱166、钆166、镱186、镱188、镱189、铅212、镭223、钍225、铁59、硒75、砷77、铈89、钼99、铈1105、钇109、镱143、钆149、钆169、铈194、金198、金199和铅211。通过使用与抗体共价连接的双功能螯合剂,可以将单克隆抗体与放射性金属离子间接偶联。螯合剂可通过友好性结合(Meares et al. (1984) Anal. Biochem. 142: 68-78)、氨基酸残基的巯基(Koyama (1994) Chem. Abstr. 120: 217-262)和碳水化合物基团(Rodwell et al. (1986) PNAS USA 83: 2632-2636; Quadri et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20: 559-570)来连接。

[0145] 此外,本发明的抗体或其片段可以与治疗剂缀合。合适的治疗剂包括:紫杉醇,细胞松弛素B,短杆菌肽D,溴化乙锭,依米丁,丝裂霉素,依托泊苷,替诺泊苷,长春新碱,长春

碱,秋水仙碱,阿霉素,柔红霉素,二羟基蒽醌二酮,米托蒽醌,光神霉素(mithramycin),放线菌素D,1-去氢睾酮,糖皮质激素,普鲁卡因,丁卡因,利多卡因,普萘洛尔和嘌呤霉素,抗代谢药(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨、克拉屈滨),烷化剂(例如氮芥、thioepa、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素C、顺铂和其他铂衍生物(例如卡铂)),抗生素(例如放线菌素、博来霉素、柔红霉素(旧称道诺霉素)、阿霉素、伊达比星、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、氨基霉素(AMC)),白喉毒素和相关分子(例如白喉A链及其活性片段和杂种分子),蓖麻毒蛋白毒素(例如蓖麻毒蛋白A或去糖基化的蓖麻毒蛋白A链毒素),霍乱毒素,志贺样毒素(SLT-I、SLT-II、SLT-IIIV),LT毒素,C3毒素,志贺毒素,百日咳毒素,破伤风毒素,大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂,假单胞菌外毒素,芦荟素,皂苷,蒴莲根毒素(modeccin),gelanin,相思豆毒素A链,蒴莲根毒素A链, α -八叠球菌素(sarcin),Aleurites fordii蛋白,香石竹毒素(dianthin)蛋白,美洲商陆(Phytolacca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S),苦瓜抑制因子,泻果素(curcun),巴豆素(croton),石碱花(sapaonaria officinalis)抑制因子,白树毒素(gelonin),米托格林(mitogellin),restrietocin,酚霉素(phenomycin),伊诺霉素毒素和混合毒素。

[0146] 其他合适的共轭分子包括核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、反义核酸、抑制性RNA分子(例如siRNA分子)、免疫刺激性核酸、适体、核酶、三链体形成分子和外部指导序列。适体是长度为15-50个碱基的小核酸,其折叠成限定的二级和三级结构,例如茎环或G四联体,并且可以结合小分子(例如ATP(美国专利号5,631,146)和茶碱(美国专利号5,580,737))以及大分子(例如逆转录酶(美国专利号5,786,462)和凝血酶(美国专利号5,543,293))。核酶是能够在分子内或分子间催化化学反应的核酸分子。核酶通常通过靶底物的识别和结合以及随后的切割来切割核酸底物。具有三链体形成功能的核酸分子可以通过形成三链体与双链或单链核酸相互作用,其中三链DNA形成依赖于Watson-Crick和Hoogsteen碱基配对的复合物。三链体分子可以高亲和力和特异性结合靶区域。

[0147] 功能性核酸分子可以充当靶分子具有的特定活性的效应子、抑制剂、调节剂和刺激剂,或者功能性核酸分子可以具有独立于任何其他分子的de novo活性。

[0148] 治疗剂可以使用多种可用方法中的任何一种直接或间接地与抗体连接。例如,通过二硫键形成、使用交联剂(例如N-琥珀酰3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP))、或通过抗体的Fc区中的糖部分,将试剂附着在还原抗体成分的铰链区。(Yu et al.1994Int.J.Cancer 56:244;Upeslakis et al.,“Modification of Antibodies by Chemical Methods,”in Monoclonal antibodies:principles and applications,Birch et al.(eds.),pages 187-230(Wiley-Liss,Inc.1995);Price,“Production and Characterization ofSynthetic Peptide-Derived Antibodies,”in Monoclonal antibodies:Production,engineering and clinical application,Ritter et al.(eds.),pages 60-84(Cambridge University Press 1995))。

[0149] 将治疗剂与抗体缀合的技术是众所周知的(Amon et al.“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy,”in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy;Reisfeld et al.(eds.),pp.243-56(Alan R.Liss,

Inc.1985);Hellstrom et al.“Antibodies For Drug Delivery,”in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.);Robinson et al. (eds.),pp.623-53 (Marcel Dekker,Inc.1987); Thorpe“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review,”in Monoclonal Antibodies’84:Biological And Clinical Applications,Pinchera et al. (eds.),pp.475-506 (1985);“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy,”in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin et al. (eds.),pp.303-16 (Academic Press 1985),以及Thorpe et al.“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates,”(1982)Immunol.Rev.62:119-58)。

[0150] 本文公开的抗体或其抗原结合区可与另一种功能分子(例如另一种抗体或受体的配体)连接,以产生与至少两种或更多种不同结合位点或目标分子结合的双特异性或多特异性分子。抗体与一个或多个其他结合分子(例如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物)的连接可以例如通过化学偶联、遗传融合或非共价结合来完成。除了第一和第二靶表位之外,多特异性分子还可包括第三结合特异性。

[0151] 可以使用本领域已知的方法制备双特异性和多特异性分子。例如,高特异性分子的每个结合单元可以分开产生,然后彼此缀合。当结合分子是蛋白质或肽时,多种偶联剂或交联剂可用于共价结合。交联剂的实例包括蛋白A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5’-二硫代双(2-硝基小苯甲酸)(DTNB)、邻苯二甲酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)(Karpovsky et al.(1984)J.Exp.Med.160:1686; Liu et al.(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648)。当结合分子是抗体时,它们可以通过两条重链的C末端铰链区的巯基键结合。

[0152] 本公开的抗体或其片段可以与对结合有抗体的细胞有毒的部分连接以形成“耗竭”抗体。这些抗体在需要消耗NK细胞的应用中特别有用。

[0153] 本文公开的抗体也可以附着于固体支持物,其对于免疫测定或靶抗原的纯化特别有用。这样的固体支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0154] 抗体也可以与许多不同的载体结合。因此,本发明还提供了包含抗体和另一种活性或惰性物质的组合物。众所周知的载体的例子包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁。为了本文公开的目的,载体的性质可以是可溶的或不溶的。本领域技术人员将知道用于结合单克隆抗体的其他合适的载体,或者将能够使用常规实验确定这种载体。

[0155] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是全长抗体。

[0156] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是单克隆抗体。

[0157] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是嵌合的或人源化的。

[0158] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体选自Fab、F(ab)’₂、Fab’、scF_v和F_v。

[0159] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体包含Fc结构域。在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是非人类动物(例如大鼠、绵羊、牛、犬、猫或兔)抗体。在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是人或人源化抗体或在人中是非免疫原性的。

[0160] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体包含人抗体框架区。

[0161] 在其他方面,本文提供的抗体的CDR中的一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸取代。就相同氨基酸家族内的取代而言,该取代可以是“保守的”。天然存在的氨基酸可分为以下四个家族,并且在这些家族中将进行保守取代。

[0162] 1) 具有碱性侧链的氨基酸:赖氨酸,精氨酸,组氨酸。

[0163] 2) 具有酸性侧链的氨基酸:天冬氨酸,谷氨酸。

[0164] 3) 具有不带电荷的极性侧链的氨基酸:天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸。

[0165] 4) 具有非极性侧链的氨基酸:甘氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,蛋氨酸,色氨酸,半胱氨酸。

[0166] 在另一方面,一个或多个氨基酸残基被添加至抗体的一个或多个CDR或从抗体的一个或多个CDR中缺失。这样的添加或缺失发生在CDR的N或C末端或CDR内的位置。

[0167] 通过通过氨基酸的添加、缺失或取代来改变抗体的CDR的氨基酸序列,可以获得各种效果,例如对靶抗原的增加的结合亲和力。

[0168] 多核苷酸、载体和宿主细胞

本发明还提供了编码一种或多种上述鉴定的多肽或抗体及其各自的互补链的分离或重组多核苷酸。还提供了包含分离的或重组的多核苷酸的载体,其实例是本领域已知的并且在本文中进行了简要描述。在一个以上的分离的或重组的多核苷酸将被表达为单个单元的一方面,分离的或重组的多核苷酸可以包含在多顺反子载体内。多核苷酸可以是DNA、RNA、mRNA或干扰RNA,例如siRNA、miRNA或dsRNA。

[0169] 本发明进一步提供了与RNA转录的启动子以及用于DNA和/或DNA的复制和/或瞬时或稳定表达的其他调控序列可操作地连接的分离的或重组的多核苷酸。如本文所用,术语“可操作地连接”是指以这样的方式定位:启动子将会指导RNA从DNA分子转录。这种启动子的例子是SP6、T4和T7。在某些实施方案中,细胞特异性启动子用于插入的多核苷酸的细胞特异性表达。含有启动子或启动子/增强子、带有终止密码子和选择标记序列、以及可将插入的DNA片段可操作地连接到该启动子的克隆位点的载体是本领域已知的并且可商购。对于一般方法和克隆策略,请参见Gene Expression Technology (Goeddeled., Academic Press, Inc. (1991)) 及其中引用的参考文献和Vectors: Essential Data Series (Gacsa and Ramji, eds., John Wiley & Sons, N.Y. (1994)), 其中包含图谱、功能特性、商业供应商以及对各种合适载体的GenEMBL登录号的参考。

[0170] 在一个实施方案中,衍生自本发明的多核苷酸的多核苷酸编码具有如本文所述的诊断和治疗效用的多肽、蛋白质、抗体或其片段,以及鉴定可能存在或可能不存在的蛋白质转录物的探针。这些核酸片段可以例如通过较大的多核苷酸的限制酶消化来制备,然后用可检测的标记物标记。或者,可以使用分子的切口翻译来产生随机片段。有关制备和标记此类片段的方法,请参见Sambrook, et al. (1989) (同上)。

[0171] 包含这些核酸的表达载体可用于获得宿主载体系统以产生蛋白质和多肽。暗示这些表达载体作为附加体或作为染色体DNA的组成部分在宿主生物中必须是可复制的。合适的表达载体的非限制性实例包括质粒、酵母载体、病毒载体和脂质体。腺病毒载体因其在体外和体内的高水平表达和有效转化细胞而特别适用于在体内将基因引入组织。当将核酸插

入合适的宿主细胞(例如原核或真核细胞)中并且宿主细胞复制时,可以重组产生蛋白质。合适的宿主细胞将取决于载体,并且可以包括原核和真核细胞,例如哺乳动物细胞、动物细胞、人细胞、猿猴细胞、昆虫细胞、酵母细胞和使用已知方法构建的细菌细胞。参见 Sambrook, et al. (1989), 同上。除了使用病毒载体将外源核酸插入细胞外,还可以通过本领域已知的方法将核酸插入宿主细胞,例如:转化细菌细胞;使用磷酸钙沉淀转染哺乳动物细胞;或DEAE葡聚糖;电穿孔;或显微注射。参见, Sambrook et al. (1989) (同上) 其中描述的方法。因此,本发明还提供了宿主细胞,例如哺乳动物细胞、动物细胞(大鼠或小鼠),人类细胞、或原核细胞(例如细菌细胞),其包含编码蛋白质或多肽或抗体或其片段的多核苷酸。

[0172] 多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,则可以在多核苷酸组装之前或之后赋予核苷酸结构修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸成分打断。多核苷酸可在聚合后进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。该术语还指双链和单链分子。除非另有说明或要求,否则本文公开的为多核苷酸的任何实施方案既包括双链形式,也包括已知或预测组成双链形式的两个互补单链形式的每一个。

[0173] 当载体用于体内或离体的基因治疗时,药学上可接受的载体是优选的,例如无复制能力的逆转录病毒或腺病毒载体。包含本发明的核酸的药学上可接受的载体可以被进一步修饰以瞬时或稳定表达所插入的多核苷酸。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”包括但不限于具有选择性靶向核酸并将核酸引入分裂细胞的能力的载体或递送载体。这种载体的一个例子是“复制能力不强”的载体,其定义为无法产生病毒蛋白,从而阻止了该载体在感染宿主细胞中的传播。复制能力不强的逆转录病毒载体的实例是LNL6(Miller et al. (1989) BioTechniques 7:980-990)。已经建立了使用复制能力不强的逆转录病毒进行逆转录病毒介导的基因标记基因转移的方法。(Bordignon (1989) PNAS USA 86:8912-8952; Culver (1991) PNAS USA 88:3155; 以及 Rill (1991) Blood 79(10):2694-2700)。

[0174] 本发明还提供了包含和/或表达本发明的多核苷酸的经遗传修饰的细胞。可以通过插入上游调控序列(例如启动子或基因激活剂)来产生经遗传修饰的细胞(参见,美国专利号5,733,761)。

[0175] 可将多核苷酸缀合至可检测的标记,例如酶标记或放射性同位素,以检测核酸和/或基因在细胞中的表达。多种合适的可检测标记是本领域已知的,包括能够给出可检测信号的荧光、放射性、酶促或其他配体,例如抗生物素蛋白/生物素。一方面,人们可能希望使用荧光标记或酶标记,例如脲酶、碱性磷酸酶或过氧化物酶,以代替放射性或其他对环境不利的试剂。在酶标签的情况下,可以使用量热指示剂底物来提供人眼可见或分光光度法的手段,以鉴定与含有互补核酸的样品的特异性杂交。因此,本发明进一步提供了用于检测单链多核苷酸或其互补序列的方法,该方法通过在允许互补单链多核苷酸杂交的条件下(优选中等严格杂交条件),或更优选在高度严格杂交条件下,使靶标单链多核苷酸与作为本发明的多核苷酸的一部分的经标记的单链多核苷酸(探针)接触。杂交的多核苷酸对与未杂交的单链多核苷酸分离。使用本领域技术人员已知的方法检测杂交的多核苷酸对,例如在 Sambrook et al. (1989) (同上) 中描述的方法。

[0176] 本发明中体现的多核苷酸可以使用化学合成、重组克隆方法、PCR、或其任何组合获得。化学多核苷酸合成的方法在本领域中是已知的,并且在此不需要详细描述。本领域技术人员可以使用本文提供的序列数据以通过采用DNA合成仪或从商业服务处获得所需的多

核苷酸。

[0177] 本公开的多核苷酸可以使用PCR分离或复制。PCR技术是美国专利号4,683,195、4,800,159、4,754,065和4,683,202的主题,并且描述于PCR:The Polymerase Chain Reaction(Mullis et al.eds.,Birkhauser Press,Boston(1994))或MacPherson et al.(1991)and (1995),以及其中引用的参考文献。或者,本领域技术人员可以使用本文提供的序列和商业DNA合成仪来复制DNA。因此,本发明还提供了用于获得本发明的多核苷酸的方法,该方法提供多核苷酸的线性序列、核苷酸、合适的引物分子、化学物质(例如酶)及其复制说明,并且以适当的方向化学复制或连接核苷酸以获得多核苷酸。在一个单独的实施方案中,进一步分离这些多核苷酸。更进一步,本领域技术人员可以将多核苷酸插入合适的复制载体中,并将载体插入合适的宿主细胞(原核或真核)中以进行复制和扩增。可以通过本领域技术人员已知的方法从细胞分离如此扩增的DNA。本文进一步提供了通过该方法获得多核苷酸的方法以及如此获得的多核苷酸。

[0178] 可以通过首先将DNA多核苷酸插入合适的宿主细胞中获得RNA。可以通过任何适当的方法,例如通过使用适当的基因递送载体(例如脂质体、质粒或载体)或通过电穿孔来递送DNA。当细胞复制并且DNA被转录成RNA时;然后可以使用本领域技术人员已知的方法分离RNA,例如如Sambrook et al.(1989)(同上)所述。例如,可以根据Sambrook et al.(1989)(同上)所述方法使用各种裂解酶或化学溶液分离mRNA,或按照制造商提供的随附说明通过核酸结合树脂提取。

[0179] 与本发明的多核苷酸表现出序列互补性或同源性的多核苷酸可用作杂交探针或作为本文鉴定的特定多核苷酸的等效物。由于转录物的完整编码序列是已知的,因此该序列或同源序列的任何部分都可以用于本发明的方法中。

[0180] 本领域已知特异性杂交不需要“完全匹配”的探针。通过少量碱基的取代、缺失或插入实现的探针序列的微小变化不影响杂交特异性。通常,可以容忍多达20%的碱基对不匹配(最佳对齐时)。优选地,用于检测上述mRNA的探针与同源区域至少约80%相同。更优选地,在同源区域比对后,探针与相应的基因序列具有85%的同一性;甚至更优选地,其表现出90%的同一性。

[0181] 这些探针可以用于放射分析(例如Southern和Northern印迹分析)中,以检测、预后、诊断或监测各种细胞或包含这些细胞的组织。探针还可以连接到固体支持物或阵列(例如芯片)上,以用于高通量筛选测定中,以检测对应于本发明的多核苷酸的基因的表达。因此,本发明还提供了探针,其包含或对应于本发明的多核苷酸或其等效物或其互补序列或其片段,其连接至固体支持物以用于高通量筛选。

[0182] 片段的总大小以及互补片段的大小将取决于特定核酸片段的预期用途或应用。较小的片段通常可用于杂交实施方案,其中互补区的长度可以变化,例如根据希望检测的互补序列为至少5至10至约100个核苷酸,或甚至全长。

[0183] 通常优选具有在长度上大于5至10个核苷酸的延伸序列上的互补序列的核苷酸探针,以增加杂交体的稳定性和选择性,从而提高获得的特定杂交分子的特异性。更优选地,可以设计具有长度为10个或更多或大于50个核苷酸、或在需要时甚至更长的基因互补序列的多核苷酸。这样的片段可以通过以下方式容易地制备:例如通过化学方法直接合成该片段,通过应用核酸复制技术,例如如美国专利4,603,102中所述具有两个引物寡核苷酸的

PCR技术,或者通过将选择的序列引入到重组载体中用于重组生产。一方面,探针的长度为约50-75个或更多个核苷酸,替代地50-100个核苷酸。

[0184] 本发明的多核苷酸可以用作用于检测在本文所述的细胞中表达的基因或基因转录物的引物。在本文中,扩增是指采用能够以合理的保真度复制靶序列的引物依赖性聚合酶的任何方法。扩增可以通过天然或重组DNA聚合酶来进行,例如T7 DNA聚合酶、大肠杆菌DNA聚合酶的Klenow片段、以及逆转录酶。仅出于说明目的,引物的长度与为探针鉴定的长度相同。

[0185] 一种扩增多核苷酸的方法是PCR,并且用于PCR扩增的试剂盒是可商购的。扩增后,可以通过本领域已知的任何适当方法来检测所得的DNA片段,例如通过琼脂糖凝胶电泳,然后用溴化乙锭染色和紫外线照射进行显像。

[0186] 已经开发了向细胞施用有效量的基因递送载体或运载体的方法,并且是本领域技术人员已知的,并且在本文中进行了描述。检测细胞中基因表达的方法是本领域已知的,并且包括诸如与DNA微阵列杂交、原位杂交、PCR、RNase保护测定和Northern印迹分析的技术。此类方法可用于检测和定量基因在细胞中的表达。或者,可以通过多种方法检测编码的多肽的表达。特别地,制备与靶多肽特异性反应的多克隆或单克隆抗体是有用的。此类抗体可用于使用免疫组织学、ELISA和Western印迹等技术可视化表达多肽的细胞。这些技术可用于确定表达的多核苷酸的表达水平。

[0187] 在一方面,包含HMG-box结构域的多肽包括野生型和重组产生的来自原核和真核宿主细胞的多肽和蛋白质。

[0188] 蛋白质和多肽可通过本领域技术人员已知的许多方法获得,包括纯化、化学合成和重组方法。可以通过诸如用抗体免疫沉淀之类的方法以及诸如凝胶过滤、离子交换、反相和亲和层析之类的标准技术从诸如宿主细胞系统之类的制品中分离多肽。对于这种方法,请参见例如Deutscher et al. (1999) *Guide To Protein Purification: Methods In Enzymology* (Vol. 182, Academic Press)。因此,本发明还提供了获得这些多肽的方法以及通过这些方法可获得和获得的产物。

[0189] 多肽还可以使用可商购的自动肽合成仪通过化学合成获得,所述肽合成仪例如由Perkin/Elmer/Applied Biosystems, Inc., Model 430A或431A, Foster City, Calif., USA. 生产的。合成的多肽可以例如通过高效液相色谱法 (HPLC) 沉淀并进一步纯化。因此,本发明还提供了一种化学合成本发明蛋白质的方法,其方法是提供蛋白质和试剂(例如氨基酸和酶)的序列,并以正确的方向和线性序列将氨基酸连接在一起。

[0190] 替代地,可以通过例如在Sambrook et al. (1989) (同上) 中描述的众所周知的重组方法,使用本文所述的宿主细胞和载体系统,获得蛋白质和多肽。

[0191] 本发明的多肽还可以与各种固相载体(例如植入物、支架、糊剂、凝胶、牙科植入物、或医学植入物)或液相载体(例如珠、无菌或水溶液、药学上可接受的载体、药学上可接受的聚合物、脂质体、胶束、悬浮液和乳液)组合。非水溶剂的实例包括丙基乙二醇、聚乙二醇和植物油。当用于在体内制备抗体或诱导免疫应答时,载体还可以包括可用于非特异性地增强特异性免疫应答的佐剂。技术人员可以容易地确定是否需要佐剂并选择一种。然而,仅出于说明的目的,合适的佐剂包括但不限于弗氏完全和不完全溶液矿物盐和多核苷酸。其他合适的佐剂包括单磷酸基脂质A (MPL)、大肠杆菌的热不稳定肠毒素的突变体衍生物、

霍乱毒素的突变体衍生物、CPG寡核苷酸和衍生自角鲨烯的佐剂。

[0192] 治疗方法

本发明的一个实施方案提供了一种用于抑制、竞争或滴定DNABII多肽或蛋白与微生物DNA结合的方法,其包括使所述DNABII多肽或蛋白或微生物DNA与本文所述的多肽接触,从而抑制、竞争或滴定所述DNABII蛋白或多肽与微生物DNA的结合。在一些方面,所述接触是体外或体内的。

[0193] 本发明的另一个实施方案提供了一种用于抑制、预防或破坏微生物生物膜的方法,其包括使所述生物膜与本文所述的多肽接触,从而抑制、预防或破坏微生物生物膜。在一些方面,所述接触是体外或体内的。

[0194] 本发明的另一个实施方案提供了一种用于破坏生物膜和清除而不增强或诱导炎症反应的方法,其包括使所述生物膜与多肽接触,所述多肽包括本文所述的B Box多肽或基本上由其组成或由其组成,从而破坏生物膜和清除而不增强或诱导炎症反应。在一些方面,所述接触是体外或体内的。

[0195] 本发明的另一个实施方案提供了一种用于在对象中抑制、预防或破坏生物膜的方法,其包括向所述对象施用有效量的本文所述的多肽,从而抑制、预防或破坏微生物生物膜。在一个方面,所述方法包括施用有效量的包括本文所述的B Box多肽或基本上由其组成或由其组成的多肽,或基本上由其组成,或由其组成。

[0196] 在另一个实施方案中,还提供了一种用于抑制、预防或治疗在对象中产生生物膜的微生物感染的方法,其包括向所述对象施用有效量的本文所述的多肽,从而抑制、预防或治疗在对象中产生生物膜的微生物感染。在一个方面,所述方法包括施用有效量的包括本文所述的B Box多肽或基本上由其组成或由其组成的多肽,或基本上由其组成,或由其组成。

[0197] 在以上实施方案中任一项的一个方面,包含HMG-box结构域、或基本上由其组成、或由其组成的多肽被描述为AB Box、A Box和B Box以及本文所述的突变体、截短体和融合蛋白(参见图3)及其等效物。

[0198] 其等效物包含与AB Box、A Box和B Box以及本文所述的突变体、截短体和融合蛋白(参见图3)至少约70%、或至少约75%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%相同的多肽,或基本上由其组成,或由其组成。在一些方面,等效物保留多肽中改变的氨基酸,并保留亲本或参照蛋白、肽、融合或突变形式的能力。在一些方面,包含HMG-box结构域的多肽包含与上述任何多肽的生物学等效物,或基本上由其组成,或由其组成。

[0199] 在一些方面,分离的或重组的蛋白是哺乳动物蛋白。在一个特定的方面,哺乳动物蛋白是鼠或人蛋白。在另一方面,该蛋白质是在真核或原核细胞中产生的哺乳动物蛋白质。可以使用本领域已知的方法对它们进行翻译后修饰。

[0200] 以上方法中的任何一种可以进一步包含向对象施用有效量的一种或多种抗微生物剂、抗原肽或佐剂,或基本上由其组成,或者由其组成。一方面,该对象是非人类动物或人类患者。一方面,患者是人类青少年或婴儿。

[0201] 所述多肽通过包括局部、透皮、舌下、直肠、阴道、眼、皮下、肌肉、腹膜内、尿道、鼻内、通过吸入或口服的方法施用。

[0202] 在一些方面,所述对象是儿科患者,并且所述多肽以用于儿科患者的制剂的形式施用。

[0203] 在以上任何实施方案中,生物膜可以包含来自表1中鉴定的微生物的微生物DNA。

[0204] 表1.可以产生生物膜的细菌菌株的例子

远缘链球菌 (*S.sobrinus*)

化脓链球菌 (*S.pyogenes*)

S.gordonii Challis

无乳链球菌 (*S.agalactiae*)

变形链球菌 (*S.mutans*)

肺炎链球菌 (*S.pneumoniae*)

解链食子酸链球菌 (*S.gallolyticus*)

金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*)

表皮葡萄球菌 (*S.epidermidis*)

大肠杆菌 (*E.coli*)

流感嗜血杆菌 (*H.influenza*)

肠炎伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enteric serovar typhi*)

放线共生放线杆菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)

YP_003255304

牙龈卟啉单胞菌 (*P.gingivalis*)

淋病奈瑟菌 (*N.gonorrhoeae*)

脑膜炎奈瑟菌 (*N.meningitides*)

NMB_1302

铜绿假单胞菌 (*P.aeruginosa*)

幽门螺杆菌 (*H.pylori*)

伯氏疏螺旋体 (*B.burgdorferi*)

卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)

艾尔托霍乱弧菌 (*V.cholera El Tor*)

洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*)

类鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)

耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*)

齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)

苍白密螺旋体Nichols (*Treponema palladium Nichols*)

产黑色素普雷沃菌 (*Prevotella melaninogenica*)

中间普雷沃菌 (*Prevotella intermedia*)

百日咳博德特氏菌 Tohama (*Bordetella pertusis Tohama*)

粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)

在一个实施方案中,将多肽局部施用于微生物感染并破坏生物膜。

[0205] 在一个实施方案中,本发明提供了一种在有需要的对象中诱导或提供免疫应答的

方法,该方法包括向该对象施用有效量的本文所述的多肽,或基本上由其组成,或者由其组成。在另一个实施方案中,所述施用是局部于需要免疫应答的地方。一方面,该方法包括给予有效量的多肽,或基本上由其组成,或由其组成,该多肽包含本文公开的B Box多肽,或基本上由其组成,或由其组成。本文描述了包含HMG-box结构域的多肽的实例。一方面,该方法包括施用有效量的多肽,或基本上由其组成,或由其组成,该多肽包含本文公开的B Box多肽,或基本上由其组成,或由其组成。

[0206] 分离的或重组的蛋白质可以是哺乳动物蛋白质,或在特定方面,是人蛋白质。在某些方面,该对象是非人类动物或人类患者。

[0207] 本发明的试剂和组合物可以与其他抗微生物剂和/或表面抗原同时或相继施用。在一个特定的方面,施用是局部于感染部位。施用的其他非限制性实例包括通过一种或多种方法,包括经皮、舌下、直肠、阴道、眼、皮下、肌内、腹膜内、鼻内、通过吸入或口服。

[0208] 在一个实施方案中,还提供了任何上述多肽在制备用于破坏生物膜或抑制、预防或治疗产生生物膜的微生物感染并提供所述的本文所述的医学益处的药物中的用途。

[0209] 对于这些方法中的一些,接触可以在体外或体内进行。当在体外接触时,该方法提供了在动物或临床研究之前确定本发明的药剂的功效的手段,并且可以用于确定本发明的药剂是否与其他抗微生物剂协同作用。当在动物模型中在体内进行时,该方法提供了在人类患者中进行研究之前确定本发明的药剂的功效的手段,并且可以用于确定本发明的药剂是否与其他抗微生物剂协同作用。

[0210] 可以通过本发明的方法治疗的微生物感染和疾病包括表1中鉴定的生物体的感染,例如,无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)或假伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)。一方面,微生物感染是流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) (不可分型) (NTHI)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和ESKAPE病原体中的一种或多种。这些微生物感染可能存在于上、中和下气道(耳炎、鼻窦炎、支气管炎)、以及慢性阻塞性肺病(COPD)的加重、慢性咳嗽、囊性纤维化(CF)或社区获得性肺炎(CAP)的并发症和/或主要病因。

[0211] 感染也可能发生在口腔中(龋齿、牙周炎),并且是由变形链球菌(*Streptococcus mutans*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、放线共生放线杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)引起的。感染也可能局限于皮肤(脓肿、“葡萄球菌”感染、脓疱疮、继发性烧伤、莱姆病),并且是由金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)引起的。尿路(UTI)感染也可以治疗,通常是由大肠杆菌(*Escherichia coli*)引起的。胃肠道(GI)感染(腹泻、霍乱、胆结石、胃溃疡)通常是由肠炎沙门氏菌血清型(*Salmonella enterica* serovar)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)引起的。生殖道感染包括通常由淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)引起。粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)可引起膀胱感染或

留置装置感染。可以通过本文公开的方法治疗与假体植入的装置(例如人工髋关节或膝关节置换物或牙科植入物)或医疗装置(例如泵、导管、支架或监测系统)相关的感染(通常由多种细菌引起)。这些装置可被涂覆或缀合至如本文所述的试剂。

[0212] 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)引起的感染也可以通过本文公开的方法治疗,并且它是新生儿细菌败血症的主要原因。也可以治疗由可能引起脑膜炎的脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)引起的感染。

[0213] 因此,适用于本文公开的方法的施用途包括鼻内、肌内、气管内、皮下、真皮内、局部施用、静脉内、直肠、鼻、口服和其他肠内和肠胃外施用途。如果需要,可以组合给药途径,或者根据药剂和/或期望的效果进行调整。活性剂可以单剂量或多剂量施用。这些方法和适合于递送的途径的实施方案包括全身性或局部性途径。通常,适用于本文公开的方法的给药途径包括但不限于肠内、肠胃外或吸入途径。

[0214] 除吸入给药以外的肠胃外给药途径包括但不限于局部、透皮、皮下、肌内、眶内、包膜内、脊柱内、胸骨内和静脉内途径,即除通过消化道以外的任何给药途径。可以进行肠胃外给药以实现抑制剂的全身或局部递送。在需要全身递送的情况下,给药通常涉及药物制剂的侵入性或全身吸收的局部或粘膜给药。

[0215] 本文公开的药剂也可以通过肠内给药递送给对象。肠内给药途径包括但不限于口服和直肠给药(例如使用栓剂)。

[0216] 通过皮肤或粘膜施用活性物质的方法包括但不限于合适药物制剂的局部施用、经皮传输、透皮传输、注射和表皮施用。对于透皮传输,吸收促进剂或离子电渗疗法是合适的方法。离子电渗疗法可以使用可商购的“贴剂”来实现,该贴剂通过电脉冲连续不断地将其产品连续几天或几天以上地递送。

[0217] 在本文公开的方法的各种实施方案中,通过吸入、注射或口服连续地以天为基础每天至少一次(QD)(在各种实施方案中每天两次(BID)、三次(TID)、甚至四次)施用试剂。通常,治疗有效日剂量可以为至少约1mg、或至少约10mg、或至少约100mg、或约200至约500mg,有时取决于化合物,高达约1g至约2.5g。

[0218] 可以根据本文公开的方法,使用胶囊、片剂、口服混悬剂、用于肌内注射的混悬剂、用于静脉内输注的混悬剂、用于局部施用的软膏或乳膏、或用于关节内注射的混悬剂来完成给药。

[0219] 本文所述的组合物的剂量、毒性和治疗功效可以通过细胞培养或实验动物中的标准药学方法来确定,例如,以确定LD₅₀(致死人群的50%的剂量)和ED₅₀(在50%的人群中治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,可以表示为LD₅₀/ED₅₀之比。在某些实施方案中,组合物表现出高治疗指数。尽管可以使用表现出毒副作用的化合物,但应注意设计一种将这类化合物靶向受影响组织部位的递送系统,以最大程度地减少对未感染细胞的潜在损害,从而减少副作用。

[0220] 从细胞培养测定法和动物研究中获得的数据可用于配制用于人类的剂量范围。在某些实施方案中,此类化合物的剂量在循环浓度范围内,其包括几乎没有毒性或无毒性的ED₅₀。取决于所用剂型和所用给药途径,剂量可以在此范围内变化。对于在该方法中使用的任何化合物,可以从细胞培养测定中初步估算出治疗有效剂量。可以在动物模型中制定剂量,以达到包括在细胞培养物中确定的IC₅₀(即,达到症状最大抑制一半的试验化合物的浓

度)的循环血浆浓度范围。这些信息可用于更准确地确定对人体有用的剂量。血浆水平可通过例如高效液相色谱法进行测量。

[0221] 在一些实施方案中,足以实现治疗或预防作用的组合物的有效量为每次施用每千克体重约0.000001mg至每次施用每千克体重约10,000mg。合适地,剂量范围是从每次施用每公斤体重约0.0001mg到每次施用每公斤体重约100mg。可以以初始剂量提供给药,然后以一个或多个“加强”剂量提供。初始剂量后一天、两天、三天、一周、两周、三周、一、二、三、六或十二个月可以提供加强剂量。在一些实施方案中,在评估对象对先前施用的反应之后施用加强剂量。

[0222] 本领域技术人员将理解,某些因素可影响有效治疗对象所需的剂量和时机,包括但不限于疾病或病症的严重程度、先前的治疗、患者的总体健康和/或年龄、以及其他疾病。此外,用治疗有效量的本文所述的治疗组合物治疗对象可以包括单一治疗或一系列治疗。在一方面,术语“治疗”不包括预防。

[0223] 本发明的组合物和相关方法可以与其他疗法的施用组合使用,或者在不存在此类疗法的情况下使用。这些包括但不限于DNase酶、抗生素、抗微生物剂或其他抗体的施用。一方面,该多肽与DNase酶一起施用以治疗微生物感染和与囊性纤维化有关的生物膜。

[0224] 在一些实施方案中,所述方法和组合物包括与本发明的组合物协同作用的脱氧核糖核酸酶(DNase)酶,例如DNA酶。DNA酶是任何催化DNA骨架中磷酸二酯键断裂的酶。已知不仅靶向十字形结构而且靶向DNA的多种二级结构的DNA酶的三个非限制性实例包括DNase I、T4 EndoVII和T7 EndoI。在某些实施方案中,当与DNA酶组合使用时,降低了破坏生物膜稳定性所需的抗DNABII抗体的有效量。当在体外给药时,可以将DNA酶直接添加到测定中或在已知会稳定酶的合适缓冲液中。DNA酶的有效单位剂量和测定条件可以变化,并且可以根据本领域已知的方法进行优化。

[0225] 在其他实施方案中,所述方法和组合物可以与抗生素和/或抗微生物剂组合。抗菌剂是杀死或抑制微生物(例如细菌、真菌或原生动物)生长的物质。尽管生物膜通常对抗生素的作用具有抗性,但是本文所述的组合物和方法可用于使涉及生物膜的感染对于治疗感染的传统治疗方法敏感。在其他实施方案中,将抗生素或抗微生物剂与本文所述的方法和组合物结合使用可减少抗微生物和/或生物膜还原剂的有效量。与本发明的方法组合使用的抗微生物剂和抗生素的一些非限制性实例包括米诺环素、阿莫西林、阿莫西林-克拉维酸盐、头孢地尼、阿奇霉素和磺胺甲恶唑-甲氧苄啶。可以通过传统方法容易地确定抗微生物剂和/或抗生素与生物膜还原剂的治疗有效剂量。在一些实施方案中,抗微生物剂与生物膜减少剂组合的剂量是平均有效剂量,该平均有效剂量已被证明对其他细菌感染是有效的,例如其中感染的病因学不包括生物膜的细菌感染。在其他实施方案中,剂量是平均有效剂量的0.1、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0或5倍。可以在添加抗DNABII抗体之前、同时或之后添加抗生素或抗微生物剂。

[0226] 在其他实施方案中,所述方法和组合物可以与治疗细菌感染的抗体组合。与本文所述的方法和组合物结合使用的抗体的一个实例是针对不相关的外膜蛋白(即OMP P5)的抗体。单独使用该抗体进行治疗不会在体外使生物膜减薄。与该抗体和生物膜还原剂的联合治疗所产生的效果要大于单独使用相同浓度的任何一种试剂所能达到的效果。当与生物

膜还原剂或减少生物膜的方法结合使用时可能产生协同作用的其他抗体包括抗rsPilA、抗OMP26、抗OMP P2和抗全OMP制剂。

[0227] 本文所述的组合物和方法可用于使涉及生物膜的细菌感染对有效治疗无生物膜的细菌感染有效的普通治疗方式敏感,否则在治疗涉及生物膜的细菌感染方面无效。在其他实施方案中,本文描述的组合物和方法可以与有效治疗涉及生物膜的细菌感染的治疗方式组合使用,但是这种另外的疗法和生物膜减少剂或方法的组合产生协同作用,使得可以减少生物膜还原剂或其他治疗剂的有效剂量。在其他情况下,这种另外的疗法和生物膜减少剂或方法的组合产生协同作用,从而增强了治疗。可以通过治疗感染所需的更短时间来证明治疗的增强。

[0228] 可以在用于减少生物膜的方法或组合物之前、同时或之后添加额外的治疗,并且可以包含在相同的结构中或作为单独的制剂。

[0229] 试剂盒

还请求保护试剂盒,该试剂盒包含进行本文所述的体外和体内方法所必需的试剂和说明书。因此,本发明提供了用于执行这些方法的试剂盒,其可以包括本发明的生物试剂以及用于执行本发明的方法的说明书,例如收集组织和/或进行筛选和/或分析结果和/或施用有效量的本文定义的生物试剂。这些可以单独使用或与其他合适的抗菌剂结合使用。

[0230] 在一个实施方案中,本发明提供了一种试剂盒,其包含如本文所述的多肽和用于分解生物膜或抑制、预防或治疗产生生物膜的微生物感染的说明书。在一个实施方案中,试剂盒进一步包含佐剂、抗原肽或抗微生物剂中的一种或多种。在又一个实施方案中,试剂盒进一步包含载体,其选自液体载体、药学上可接受的载体、固相载体、药学上可接受的载体、植入物、支架、糊剂、凝胶、牙科植入物或医疗植入物。

[0231] 以下实施例旨在说明而非限制本发明。

[0232] 细菌生物膜介导的感染占有慢性/复发性人类感染的约80%。生物膜构成微生物生长的受保护模式。即,它们由附着于表面并嵌入其自身合成的水合聚合物基质中的微生物群落组成。这些无柄群落的形成允许细菌在不利的环境中生存,从而使其固有地抵抗包括抗菌剂和宿主防御在内的常规治疗方式。与生物膜有关的感染非常普遍,并且在可归因的死亡率和经济负担方面与臭名昭著的后果有关,因此迫切需要新颖的治疗方法。在这方面,申请人开发了一种新的免疫疗法,用于治疗顽固性细菌生物膜介导的感染。这种新方法基于生物膜细胞外基质中发生的核蛋白相互作用。已知生物膜细胞外基质由蛋白质、脂质、多糖和细胞外DNA (eDNA) 的可变混合物组成。对细菌生物膜结构完整性至关重要的细胞外基质的关键成分是eDNA和细菌DNABII家族的蛋白质 (IHF和HU)。DNABII蛋白以高亲和力结合并弯曲双链DNA (dsDNA) 以预弯曲DNA (图1)。体内已显示,在形成的生物膜中存在着交错的eDNA链的庞大网络,该网络被位于eDNA弯曲交叉链的顶点处的DNABII蛋白所稳定。申请人在此公开了具有一个或多个HMG-box结构域的真核来源的多肽 (例如HMGB1),可以干扰生物膜内部的细胞外DNA支架的结构。通过与结合在生物膜中的DNA支架上的微生物蛋白竞争,这些多肽使生物膜不稳定,这导致宿主免疫系统破坏和去除生物膜 (图2)。

[0233] 这种新的治疗方法是创新的,因为这是首次对HMGB1及其变体进行细菌抗生物膜治疗潜力的测试。而且,测试了具有不同抗生物膜和抗炎特性的HMGB1结构域和突变变体、A box、B box、C尾和A+B Box (图3),以确定具有最佳抗微生物膜、较少的抗炎活性和最小的蛋

白质片段大小的最佳蛋白质片段。在这方面,该蛋白质片段将能够治疗细菌生物膜疾病,而没有过度炎症的后果。此外,由于细菌从生物膜中释放使这些细菌更易于受到抗生素介导的杀灭,这表明HMGB1治疗可潜在地与常规治疗(如抗生素)结合使用,这将提高抗生物膜功效并减少抗菌素抗性的产生。

[0234] 使用体外生物膜测定法来测试HMGB1及其变体对已建立的细菌生物膜的影响。申请人表达(在大肠杆菌中)并>95%纯化了人类重组全长HMGB1(rHMGB1;1-215)、C45S突变变体(mHMGB1)和HMGB1结构域A Box(1-89)、A+B Box(1-176)、B Box(80-179)和B Box C106S(mB Box)(图3)。所有全长和HMGB1变体都保留了DNA结合活性,这表明这些结构域被正确折叠并具有功能(图4)。为了评估HMGB1及其变体以及市售天然牛HMGB1(用作对照)对已建立的细菌生物膜的影响,在生长24小时后,将每种蛋白质(200nM)添加到预先形成的肺炎克雷伯菌生物膜中。孵育16小时(总生物膜生长40小时)后,将生物膜用LIVE/DEAD®染色,并使用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)和COMSTAT分析进行分析,以计算生物膜的平均厚度和总生物量。全长重组HMGB1能够显著破坏已建立的肺炎克雷伯菌生物膜,同样的是所有包含B Box结构域的截短的HMGB1形式(图5)。这项研究的结果引起了一个值得注意的观察,即单剂量的这些非抗微生物化合物能够破坏顽固的生物膜。另外,HMGB1变体破坏了迄今为止测试的每种细菌物种,包括致病性大肠杆菌、新洋葱伯克霍尔德菌、不可分型流感嗜血杆菌(图6)。在这种浓度下的单剂量从其防护罩中释放出细菌,使其容易受到抗生素和免疫系统的清除。

[0235] 申请人使用诸如HMGB1蛋白之类的非抗微生物剂及其变体来治疗生物膜相关感染的新颖方法代表了对经典治疗概念的根本偏离。测试了全长HMGB1和具有在体外发现的最大破坏活性的迄今为止测试的最小变体B Box和修饰的B Box(mB Box)(其中106位的半胱氨酸突变为丝氨酸以消除其炎症诱导能力)在体内的生物膜破坏和炎性活性(图7)。利用聚集生物膜感染肺模型,申请人显示HMGB1、B Box和各自的修饰形式能够防止体内生物膜形成,并且修饰的蛋白质不诱导炎症反应(图7B和图7C)。申请人进一步证明,HMGB1变体均未以能够破坏生物膜的给定剂量诱导败血症(图7D)。

[0236] 方法

实验1

肺炎克雷伯菌(KP)是医院感染的常见原因,被用于所有BB破坏测定。人重组全长HMGB1(rHMGB1;1-215)、C45S突变变体(mHMGB1)和HMGB1结构域A Box(1-89)、B Box(90-176)、AB Box(1-176)、B-接头Box(80-179)和B-接头Box C106S在大肠杆菌中表达,并纯化至>95%。为了评估rHMGB1和各个结构域对已建立的BB的影响,在24小时内将每种蛋白质(200nM)添加到预先形成的BB中。在40小时,将BB洗涤,用LIVE/DEAD®染色,通过共聚焦激光扫描显微镜观察并通过COMSTAT分析图像以计算平均厚度和生物量。

[0237] 与未经处理的KP生物膜相比,外源rHMGB1及其单个结构域,除A Box外,都导致KP生物膜的平均厚度(AT)和生物量(BM)显著降低($p < 0.05$)。(AT中的%减少平均值 $\pm$ SE:44% $\pm$ 0.33、75% $\pm$ 0.04、63% $\pm$ 0.1、77% $\pm$ 0.03、64% $\pm$ 0.08、54% $\pm$ 0.15,而BM中:61% $\pm$ 0.01、80% $\pm$ 0.01、68% $\pm$ 0.02、67% $\pm$ 0.01、73% $\pm$ 0.02、56% $\pm$ 0.02,分别由rHMGB1、mHMGB1、B-Box、B-接头Box、AB Box和B-接头Box C106S诱导产生)。

[0238] 实验2

HMGB1破坏病原性生物膜:为了测试HMGB1对细菌生物膜的影响(图5),申请人克隆(IMPACT®,NEB Ipswich,MA)、表达(在大肠杆菌中)并且纯化了(肝素琼脂糖凝胶层析至纯度>95%)无标签人重组HMGB1(rHMGB1)和工程化的C45S变体(mHMGB1)(其模仿HMGB1的还原形式)。rHMGB1容易在C23和C45之间形成分子内二硫键,有助于促炎活性,而mHMGB1则不能。评估这些HMGB1同种型破坏已建立的生物膜(添加前形成24h)的能力。暴露于单一剂量的rHMGB1(200nM;比典型的脓毒症血清浓度高25倍,但不能直接诱导脓毒症)暴露16h后,用LIVE/DEAD®对由多种高优先级物种形成的生物膜进行染色,使用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)和COMSTAT分析进行分析,并与对照生物膜进行比较。申请人观察到每种生物膜的平均厚度和生物量(未显示)显著降低($P<0.05$) (图5A)。只有粪肠球菌和金黄色葡萄球菌需要较高的浓度(尽管非杀菌性)才能达到相似的结果。还显示出与rHMGB1相比,从小牛胸腺纯化的天然HMGB1(nHMGB1;Chondrex, Inc, Redmond, WA)等效地破坏了选定的生物膜(UPEC、Bc、NTHI、肺炎克雷伯氏菌)(图5A),这表明nHMGB1和rHMGB1之间在翻译后修饰(PTM)中的任何潜在差异不会显著影响这种抗生物膜功能。通过LC-MS/MS分析((MS Bioworks, LLC Ann Arbor, MI)对PTM进行的初步分析表明,rHMGB1和nHMGB1的修饰都最小(观察到的肽的<20%具有任何给定的PTM,图1C)。逐渐升高的rHMGB1浓度(最高400nM)以剂量依赖的方式破坏UPEC生物膜,直至单层(平均厚度约1 μ m;图5B),即完全消除了3D生物膜结构,这意味着可以减少生物负荷,使得宿主免疫效应物或其他抗菌化合物可以完成根除。因此,尽管病原体之间的敏感性存在内在差异,但是由所有测试的高优先级病原体形成的生物膜对单剂量的这些非抗微生物化合物敏感。

[0239] 实验3

HMGB1结构域结构和抗生物膜活性:申请人随后产生了重组HMGB1截短变体,其为1) A Box,其是自包含的DNA结合结构域(残基1-89);2) A-B Box构建体(缺少C尾;残基1-185);以及3) B Box(残基80至176,图1A和1C)。向已建立的生物膜(UPEC、Bc、NTHI和肺炎克雷伯氏菌)添加A Box对测得的生物膜参数无明显影响(图5C)。相反,A-B Box和97个氨基酸(AA)的B Box保留了完整的抗生物膜活性(图5C)。由于只有B Box可以调节DNA弯曲,因此不受理论的束缚,可以推测HMGB1至少部分地通过DNA结合/弯曲来破坏生物膜。据报道,B Box包含促炎活性,主要通过依赖于残基C106的TLR4-MD2相互作用介导,因此申请人创建了具有C106S突变的修饰的B Box变体(mB Box)(图1A和1C)。与B Box相比,mB Box变体在体外等效地破坏了细菌生物膜(UPEC、NTHI、Bc、肺炎克雷伯氏菌)(图5C)。

[0240] 实验4

rHMGB1和mHMGB1在两种不同的动物模型中破坏生物膜,但是炎症反应通过Cys至Ser突变而大大减弱:申请人使用由于NTHI 49、67、68导致的成熟的实验性OM黄鼠模型(其中粘附的粘膜生物膜形成在发病机理中起关键作用)测试了rHMGB1和mHMGB1的治疗中耳感染的能力以及相应的炎症反应(图8A)。通过小腓肠肌注射1000CFU NTHI接种性别混合的成年黄鼠的中耳。攻击后第4天和第5天,此时中耳空间中存在大量生物膜,将5 μ g (0.2nmol) rHMGB1、mHMGB1或稀释剂直接递送至中耳(共2次处理)。在第6天,处死动物,对中耳成像并对残留的生物膜(图8A)和粘膜炎症(图8B)进行盲评分。用稀释剂处理的动物具有厚的粘膜生物膜,该生物膜掩盖了骨隔(图8C和8D)。与之形成鲜明对比的是,在用rHMGB1或mHMGB1处理的动物中,残留的粘膜生物膜被大大减少,而CFU减少了约1000倍(图8E)。这些结果特别

值得注意,因为由NTHI体外形成的生物膜对HMGB1添加的反应不如其他测试细菌物种(图5)。与mHMGB1和稀释剂处理的动物(数据未显示)相比,从rHMGB1处理的动物收集的中耳液(MEF)具有增加的促炎性细胞因子(IL-1 β (3倍), IL-17A (2倍)),与rHMGB1增强了中耳粘膜的可见炎症一致(图8C和8F)。相反,来自mHMGB1处理的动物的MEF具有增加的抗炎细胞因子(IL-4 (2倍), IL-10 (5倍)) (数据未显示),其对应于减少的粘膜炎症(图8C和8F)。因此,mHMGB1有效地促进了体内NTHI生物膜的清除,并且没有触发促炎信号。接下来,申请人确定了rHMGB1或mHMGB1是否可以阻止聚集生物膜发育。对于预防,用 10^7 CFU的Bc气管内(i.t.)攻击成年C57BL/6小鼠,并同时添加0.2nmol的rHMGB1或mHMGB1。18小时后,对小鼠实施安乐死,并收集支气管肺泡灌洗液(BAL)和肺脏。Bc形成聚集体,在用Bc抗体探测的肺部中很容易看到这些聚集体(图7A)。将组织匀浆并列举CFU。与对照小鼠相比,施用了rHMGB1或mHMGB1的小鼠的BAL(图7B)和肺组织中的Bc明显减少(数据未显示; $P<0.05$),这表明HMGB1抑制了鼠气道中生物膜的形成,并且这个过程促进了细菌清除。用B Box和mB Box衍生物处理的初步结果表明,这些97AA多肽抑制体内生物膜的发育(BAL中CFU的降低,图7B),并且C106S突变消除了促炎活性(与B Box相比降低了2倍)(图7C)。然后将该动物模型用于研究Bc攻击后72h的肺损伤以及rHMGB1或mHMGB1的给药。收集肺并将组织固定,包埋在石蜡中,切片,并用苏木精和曙红(H&E)染色。用mHMGB1处理的小鼠的肺部更接近未感染的小鼠肺部,而在rHMGB1处理的小鼠中发生了严重的炎症和中性粒细胞反应增强(图7D),这表明mHMGB1保留了抗生物膜活性而没有rHMGB1的促炎活性。接下来,申请人评估了rHMGB1和mHMGB1治疗已建立的Bc感染的能力。如上所述攻击小鼠,并在24小时后施用0.2nmol rHMGB1或mHMGB1。处理后48小时,对小鼠实施安乐死,并如上所述收集和处理BAL和肺。用rHMGB1或mHMGB1处理的小鼠在其肺中具有显著较少的Bc(图7E),而mHMGB1处理诱导较少的中性粒细胞和炎性单核细胞向肺募集($P<0.05$,数据未显示)。这些数据一起表明,mHMGB1和mB Box并未增强炎症反应,但抑制了聚集生物膜的形成、细菌的吸收和清除。为了进一步证实mHMGB1的促炎活性降低,申请人使用了趋化作用的体内模型来确定募集嗜中性粒细胞的相对能力70、71。给C57BL/6小鼠腹膜内(i.p.)注射0.2nmol的mHMGB1或rHMGB1或1ml的4%巯基乙酸盐(阳性对照;中性粒细胞募集的诱导剂)。4小时后,对小鼠实施安乐死并进行腹膜灌洗。用抗CD45、抗CD11b和抗Ly6G抗体对细胞进行染色,并通过荧光激活细胞分选术(FACS)对总中性粒细胞进行定量。rHMGB1诱导了中性白细胞募集至腹膜腔,而mHMGB1则没有(图7F)。

[0241] 实验5

HMGB1变体在治疗生物膜疾病所需的剂量下不诱发败血症:尽管具有Cys至Ser突变的HMGB1变体(mHMGB1,mB Box)不与单剂量HMGB1和B Box一样诱导促炎性后遗症,但仍显示出有效的抗生物膜活性,尽管如此,申请人还是严格研究了我们的HMGB1变体在存在或不存在LPS的情况下是否会引起败血症。申请人使用0.2nmol(在体内生物膜处理中显示出治疗效果的相同量)的无内毒素的rHMGB1、B Box或mB Box(用高容量内毒素去除树脂(Pierce, Inc)纯化并通过内毒素定量(Genscript)验证为包含 <300 pg内毒素/ μ g蛋白)腹膜内注射幼稚小鼠或以非致死剂量的LPS(5m/kg)致敏的小鼠。监测小鼠24小时的败血症迹象,然后通过ELISA测量血清TNF- α (TNF- α)水平作为败血症诱导的替代物。在研究终点之前,没有小鼠表现出需要安乐死的败血症迹象。单独的LPS诱导超过100pg/ml的TNF,而

rHMGB1、B Box或mB Box都不能单独引发可检测的TNF,并且当施用于LPS致敏的小鼠时,它们均不诱导另外的促炎性信号传导(图7G)。据报道,与我们的剂量相比,需要>450倍的单独的B Box,或用脂多糖(LPS)致敏的小鼠在40小时内4剂量的2倍更大的rHMGB1来诱导败血症。另外,如上所述,在体外测试了这些无内毒素的多肽的抗生物膜活性,发现它们保持了针对UPEC和Bc生物膜的全部功能(数据未显示)。因此,此处测试的变体在有效的治疗剂量下不会诱发败血症。

[0242] 实验6

HMGB1对生物膜的破坏使释放的细菌对抗生素敏感:如上所述将200nM HMGB1、1μg/ml米诺环素或两者添加到Bc生物膜。LIVE/DEAD®染色剂的使用显示了协同的细菌杀灭作用(图9),这表明HMGB1治疗可用于联合治疗,既可提高抗菌功效,又可降低抗菌素耐药性的发展。

[0243] 实验7

HMGB1和DNABII蛋白存在于体内形成的生物膜中:申请人先前证明,在OM实验模型中NTHI形成的生物膜中,细菌DNABII蛋白位于eDNA交叉链的顶点。为了确定在体内形成的NTHI生物膜中HMGB1的相对存在和空间分布,用HMGB1和DNABII抗体探测从黄鼠中耳中回收的未固定生物膜。eDNA用DAPI(白色)染色。沿dsDNA链的长度以不同的周期性标记的HMGB1,与标记的DNABII蛋白非常接近,但并不共定位,其在eDNA的交叉链上检测到(如预期的那样)(图10A)。值得注意的是,在顶点处未观察到HMGB1。这些数据表明,HMGB1可以整合到EPS中,但不会同时占据与DNABII蛋白相同的eDNA位点(顶点),这支持了HMGB1在eDNA顶点与DNABII蛋白竞争以破坏EPS稳定性的假设。这些数据还表明,DNABII和HMGB1蛋白不会共定位,因此不会产生有效的相互作用,并且进一步表明HMGB1可能仅通过DNA结合/弯曲起作用。

[0244] 实验8

HMGB1破坏临床标本中存在的生物膜:慢性疾病部位(例如CF肺)的生物膜由多种物种组成,因此很难根除。已经显示抗DNABII抗体破坏存在于CF痰中的生物膜。含有1M B box的PBS中的CF痰液悬浮液,在37℃下孵育2h可以有效地破坏痰液,并达到与添加高浓度Pulmozyme®(一种在CF患者中用作黏液溶解剂的治疗性DNA酶)或抗DNABII相同的程度(图10B)。这些数据表明,在慢性感染部位形成的生物膜具有保守的eDNA依赖性结构,该结构易受HMGB1感染,并证明HMGB1是对生物膜的宿主防御。

[0245] 实验9

许多口腔细菌(例如放线共生放线杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*))与炎性疾病(例如牙周炎和种植体周围炎)的发病机理有关,所述炎性疾病破坏了牙槽骨和牙龈。缺乏有效的动物模型阻碍了对这些细菌的发病机理的研究。研究特定细菌的致病性的挑战之一是当将外源细菌引入动物口腔时难以建立生物膜。尽管已经开发出牙周炎的动物模型,但很少能从被接种动物的口腔中回收可培养细菌。建立可以评估特定细菌的致病性的有效动物模型将极大地帮助阐明其致病机制。该实施例提供了在治疗口腔疾病中测试所公开的多肽和组合物及其功效的模型。

[0246] 通过用A103(100μm)喷砂和HCl蚀刻(在80℃下pH 7.8 20分钟)来修饰机器加工的

钛牙科植入物的表面(1.2×4.5mm)。将经过机械加工和具有纳米纹理的植入物在接种了放线共生放线杆菌(Aa)的D7S临床菌株的TSB培养基中于37℃孵育1至3天。使用LIVE/DEAD® BacLight®染色后,通过SEM以及共聚焦激光扫描显微镜对植入物上的细菌生物膜进行分析。将有或没有建立Aa生物膜的植入物经粘膜放置在雌性大鼠上颌前磨牙和切牙区之间的牙槽骨中。为了检测体内放置的植入物上Aa生物膜的存在,在2天后从唾液和植入物的口腔表面收集细菌样品。可以通过培养以及PCR分析来检测Aa。植入后六周可进行植入物周围骨和粘膜组织的显微CT和组织学分析。如本文所述,测定多肽和组合物以及与表面连接以及生物膜和细菌生长。

[0247] 实验10

该实验提供了用于临床前测试干扰素治疗莱姆病的小鼠模型。参见Dresser et al. Pathogens 5(12):e1000680, Epub 2009年12月4日。莱姆病是美国最常见的蜱传播疾病。根据定义,随着人口继续从城市转移到郊区和农村地区和白尾鹿(其携带蜱种类Ixodes)越来越多地在这些地区漫游,这些流行地区正在扩大。莱姆病是由微生物伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*) (一种螺旋体)引起的。伯氏疏螺旋体通过Ixodes蜱叮咬传播,然后通过血液传播到其他组织和器官。

[0248] 在该动物模型中,通过背侧皮下和腹膜内注射,或通过静脉内注射,向C3H/HeN小鼠注射螺旋体。感染后约7天,回收血液和活检标本,以评估微生物负荷并评估组织和器官的病理状况。预期本发明的方法和组合物将开发用于减少和/或消除在攻击后形成的并被认为对疾病的发病机理和慢性性质都有贡献的所得到的伯氏疏螺旋体生物膜的治疗和预防策略。

[0249] 实验11

该实验提供了用于临床前测试所公开的多肽和组合物以治疗肺部疾病(例如COPD和囊性纤维化)的猪模型。参见Stoltz et al. (2010) Science Translational Medicine 2(29):29ra31。囊性纤维化是一种常染色体隐性遗传疾病,归因于编码CF跨膜电导调节剂(称为CFTR)阴离子通道的基因突变。在该模型中,经过专门繁殖来携带被称为“CFTR”的基因的缺陷的猪被称为CF猪,其自然发展出CF肺部疾病的标志性特征,其中包括多种细菌形成的下呼吸道感染。可以给猪施用组合物,以通过雾化将多肽递送至这些动物的肺部,以评估疾病迹象和相关病理的改善。

[0250] 实验12

申请人还提供了结核病(TB)的临床前模型。参见Ordway et al. (2010) Anti-Agents and Chemotherapy 54:1820。在该动物模型中,将SPF豚鼠饲养在屏障菌落中,并通过雾化喷雾进行感染,以将约20cfu的结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)菌株Erdman K01细菌运送到它们的肺中。在攻击后第25、50、75、100、125和150天,处死动物并测定细菌负荷并恢复组织以进行组织病理学评估。与不产生经典TB症状的小鼠不同,以这种方式攻击的豚鼠会形成组织良好的肉芽肿,并伴有中央坏死,这是人类疾病的标志。此外,豚鼠与人类一样,会发展为引流性淋巴结的严重脓性肉芽肿和坏死性淋巴结炎,这是原发性病变复合物的一部分。该模型的使用将提供临床前筛查,以确认和鉴定减少和/或消除所产生的结核分枝杆菌生物膜的治疗及预防策略,已观察到在攻击后这些动物的肺部形成生物膜。据认为,其有助于该疾病的发病机理和慢性病。

[0251] 实验13

导管/留置装置生物膜感染的多种动物模型是已知的。参见Otto (2009) Nature Reviews Microbiology, 7:555。尽管通常被认为是正常的皮肤菌群,但微生物表皮葡萄球菌已成为许多人认为是关键的机会病原体,在医院感染的病原体中排名第一。首先,这种细菌导致在留置医疗器械上发生的大多数感染,这些感染在器械插入过程中被该常见的皮肤定植器污染。虽然通常不会危及生命,但与这些生物膜感染的治疗相关的困难及其发生频率使它们成为严重的公共卫生负担。有几种与导管有关的表皮葡萄球菌感染的动物模型,包括兔子、小鼠、豚鼠和大鼠,所有这些模型均用于研究发病机理的分子机制,并有助于进行预防和/或治疗。大鼠颈静脉导管已用于评估干扰粪肠球菌、金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌生物膜形成的疗法。生物膜的减少通常通过以下三种方法进行测量:(i)对导管进行超声处理并计算CFU, (ii)切下导管的切片或简单地放在板上并刻划,或者(iii)生物膜可以用结晶紫或另一种染料染色,并进行洗脱和测量OD (作为CFU的替代指标)。

[0252] 结论

全长重组HMGB1能够显著破坏已建立的生物膜,同样的是所有包含B Box结构域的截短的HMGB1形式。

[0253] 等效物

除非另有定义,否则本文所用的所有的技术和科学的术语都具有如本发明的所属领域中的普通技术人员中的一个通常所理解的相同的含义。

[0254] 可以在缺少在本文没有具体公开的任何元素或限制的情况下,适当地实施本文说明性地描述的本技术。因此,例如,术语“包括”、“包含”、“含有”等应该被广泛且没有限制地理解。此外,本文采用的术语和表达已经被用作描述而非限制,在这些术语和表达的使用中,没有意图排除所示和所述特征或其部分的任何等效物,但是应该认识到,在本发明技术的范围之内各种变化都是可能的。

[0255] 因此,应该理解,这里提供的材料、方法和示例代表优选的方面,是示例性的,并且不意图限制本技术的范围。

[0256] 本文广泛地和一般地描述了本技术。落入一般性公开之内的较窄的种类和亚属分组中的每一个也都形成本公开的一部分。这包括了具有从该属中移除任何主题的附带条件或负面限制的本技术的一般性描述,无论被删除的材料是否在本文中被具体描述。

[0257] 此外,在以马库什组描述本技术的特征或方面的情况中,本领域技术人员将认识到,还借此以该马库什组中的任何单独成员或成员的亚组描述了本公开的实施方案。

[0258] 在本文中提及的所有公开文献、专利申请、专利和其他参考文献,其整体都以引用的方式明确地合并入本文中,至如同每个都单独地以引用的方式合并的相同程度。如发生冲突,以本说明书(包括定义)为准。

[0259] 其他方面在所附权利要求书中提出。

[0260] 序列表

SEQ ID NO:1和2-野生型HMGB1(小鼠和人)

**1 MGKGDPKKPR RKMSSYAFFV QTCREEHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK
TMSAKEKGKF**

**61 EDMAKADKAR YEREMKTYIP PKGETKKKFK DPNAPKRPPS AFFLFCSEYR
PKIKGEHPGL**

**121 SIGDVAKKLG EMWNNTAADD KQPYEKKA EK LKEYEKDIA AYRAKGKPD
AKKGVVKA EK**

181 SKKKKEEEEG EDEEDEEEEE EDEEDEEEEE DDDDE (小鼠)

1 mgkgdpkkpr gkmssyaffv qtcreehkkk hpdasvnfse fskkcserwk tmsakekgkf

61 edmakadkar yeremktyip pkgetkkkfk dpnapkrpps afflcseyr pkikgehpgl

121 sigdvakklg emwnntaadd kpyekkaek lkeyekdia ayrakgkpd akkgvvkaek

181 skkkkeeeed eedeedeede eedeedeede dddde

(人,复制自GenBank登录号CAE48262.1)

HMGB1是由215个氨基酸组成的小蛋白(约30Kda),由3个结构域组成:两个带正电荷的结构域A和B box,每个由80个氨基酸组成;以及带负电荷的羧基末端(酸性的C尾),由大约30个连续的天冬氨酸和谷氨酸残基组成。

[0261] 粗体氨基酸(氨基酸1-70)描述了A Box结构域。

斜体氨基酸(约氨基酸88-164)描述了B Box结构域。

[0262] 带下划线氨基酸(氨基酸186-215)描述了C-尾结构域。

[0263] HMGB1的突变形式显示在图1和图3中,其具有氨基酸取代。

[0264] SEQ ID NO: 3和4

野生型小鼠HMGB1 B Box:MW=9735.2;87aa

KDPNAPKRPPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKA
KLKEYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVV

野生型人HMGB1 B Box:87aa

KDPNAPKRPPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKA
KLKEYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVV

SEQ ID NO:5和6

小鼠突变HMGB1 B Box:MW=9735.2;87aa

KDPNAPKRPPSAFFLFSSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKA
KLKEYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVV

人突变HMGB1 B Box:87aa

KDPNAPKRPPSAFFLFSSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKA
KLKEYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVV

半胱氨酸(C)已突变为丝氨酸(S)(加粗文本)。

[0265] SEQ ID NO:7和8

野生型小鼠HMGB1 A+B Box:MW=20261.42;176aa

MGKGDPKKPRRKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGK
FEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGL

SIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKA~~EKLKEKY~~EKDIAAYRAKGKPDAAKKG~~VV~~野生型人HMGB1
A+B Box:176aa

MGKGD~~PKKPRG~~KMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEK~~GK~~
FEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSAFFLFCSEYR~~PKIKGEHPGL~~

SIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKA~~AKLKEKY~~EKDIAAYRAKGKPDAAKKG~~VV~~半胱氨酸(C)已
突变为丝氨酸(S) (加粗文本)。

[0266] SEQ ID NO:9和10

野生型小鼠HMGB1 B Box+N-接头(下划线):MW=10876.6;97aa PPKGETKKKFKDPN
APKRPPSAFFLFCSEYR~~PKIKGEHPGL~~SIGDVAKKLGEMWNNTAADD KQPYEKKAEKLKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKG~~VV~~

野生型人HMGB1 B Box+N-接头(下划线):97aa
PPKGETKKKFKDPNAPKRPPSAFFLFCSEYR~~PKIKGEHPGL~~SIGDVAKKLGEMWNNTAADD
KQPYEKKAAKLKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKG~~VV~~

SEQ ID NO:11和12

突变HMGB1 B Box+N-接头(下划线):MW=10876.6;97aa
PPKGETKKKFKDPNAPKRPPSAFFLFSSEYR~~PKIKGEHPGL~~SIGDVAKKLGEMWNNTAADD
KQPYEKKAEKLKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKG~~VV~~

人HMGB1 B Box+N-接头(下划线):97aa

PPKGETKKKFKDPNAPKRPPSAFFLFSSEYR~~PKIKGEHPGL~~SIGDVAKKLGEMWNNTAADD KQPYEK
KAAKLKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKG~~VV~~。

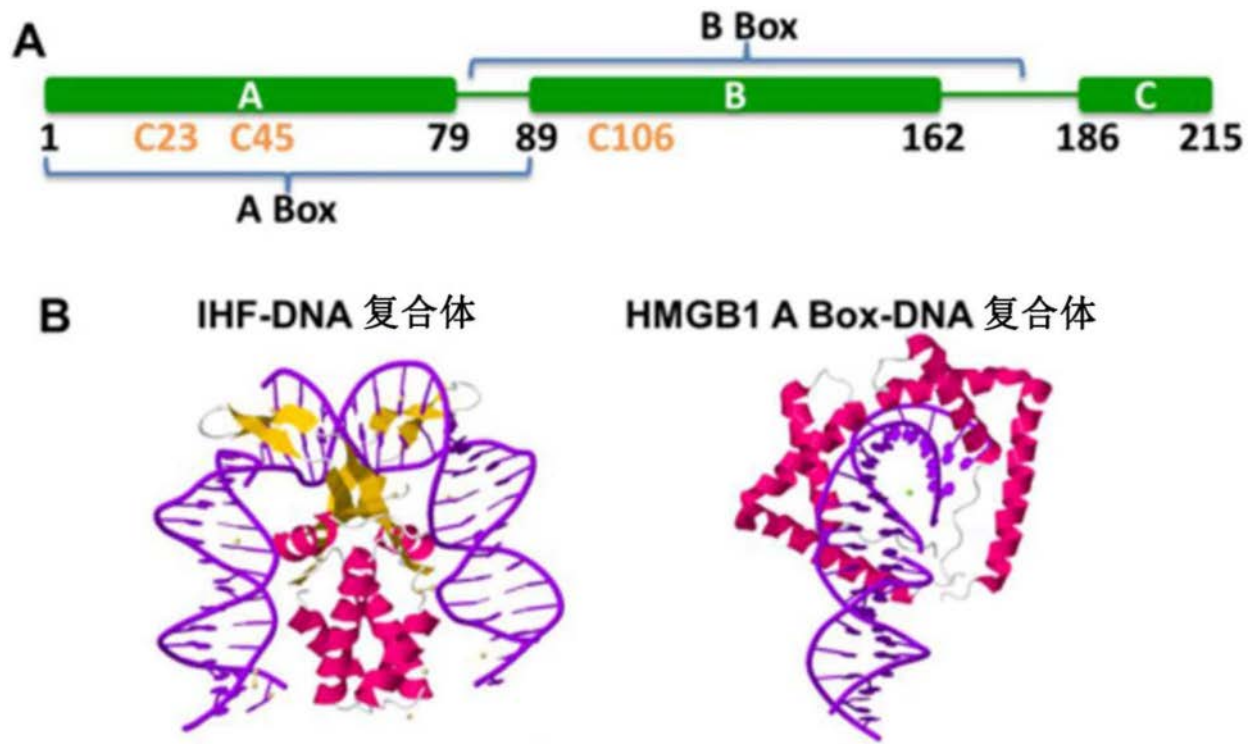


图1A-1B



图1C-1D

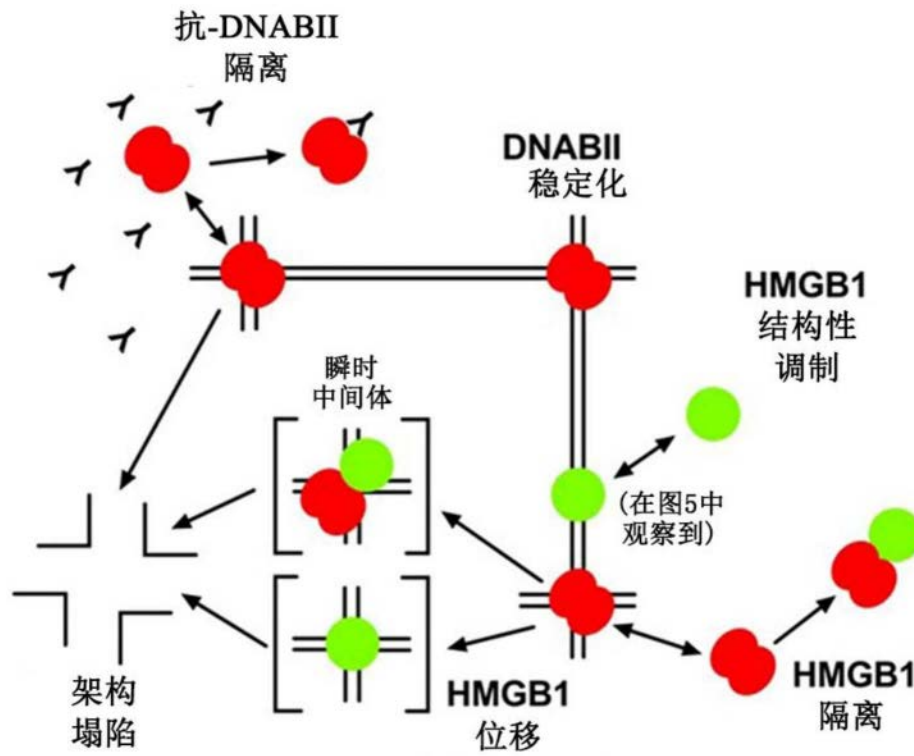


图2

HMGB1和HMGB1的结构域删除变体

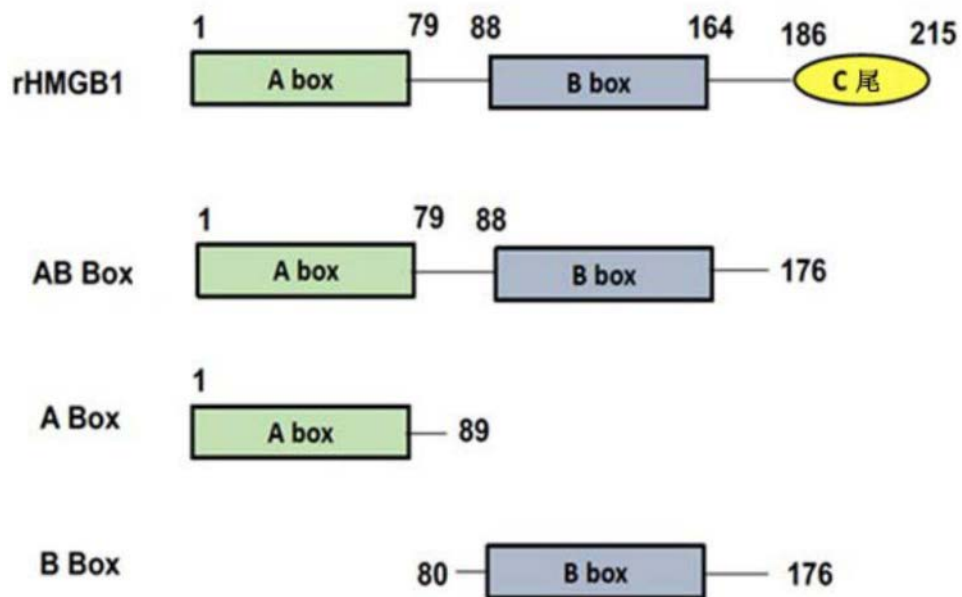


图3

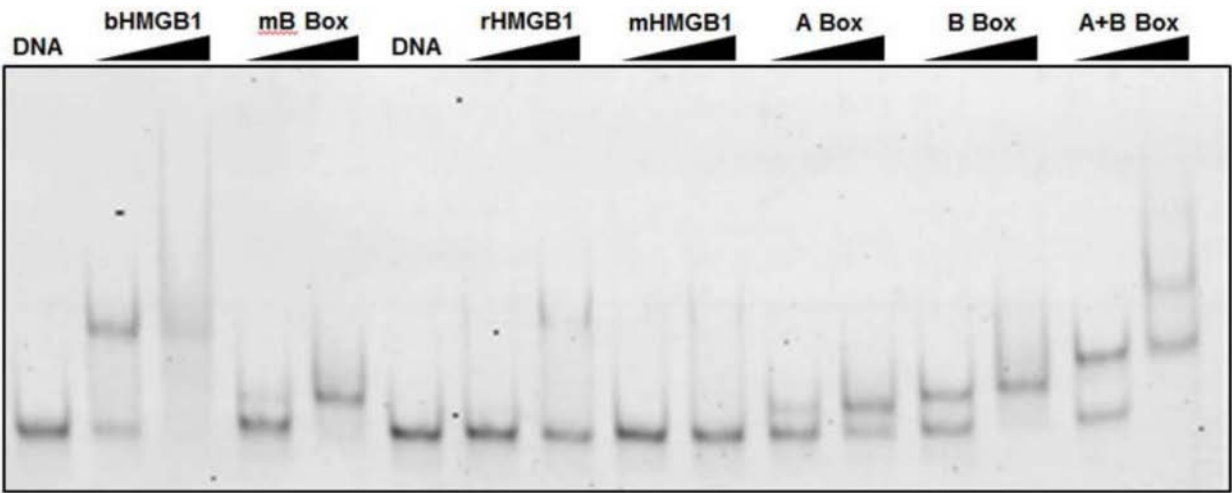


图4

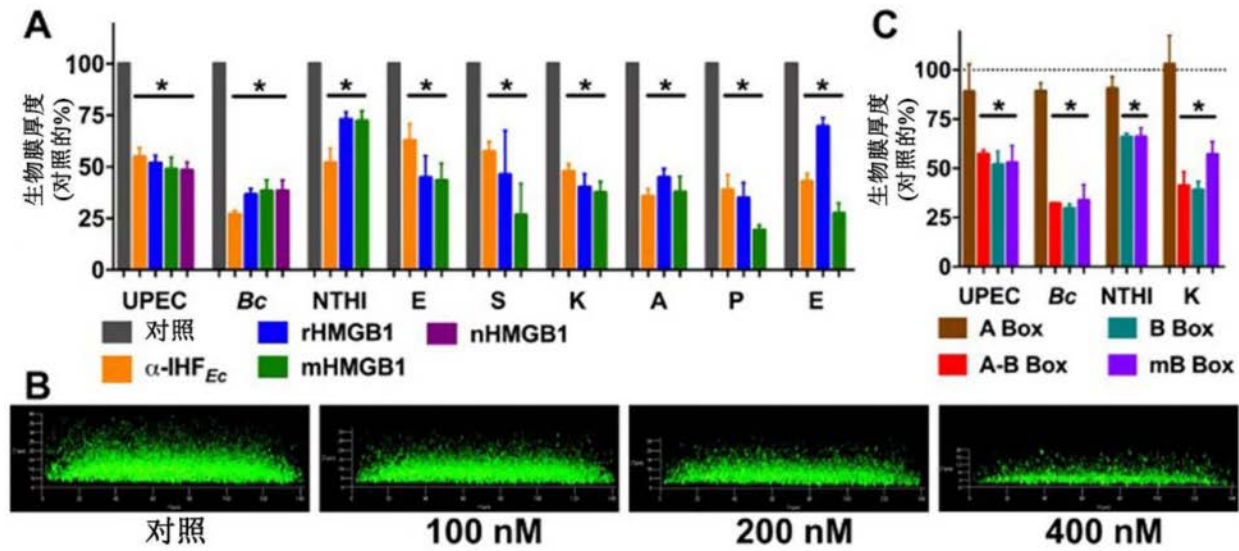


图5A-5C

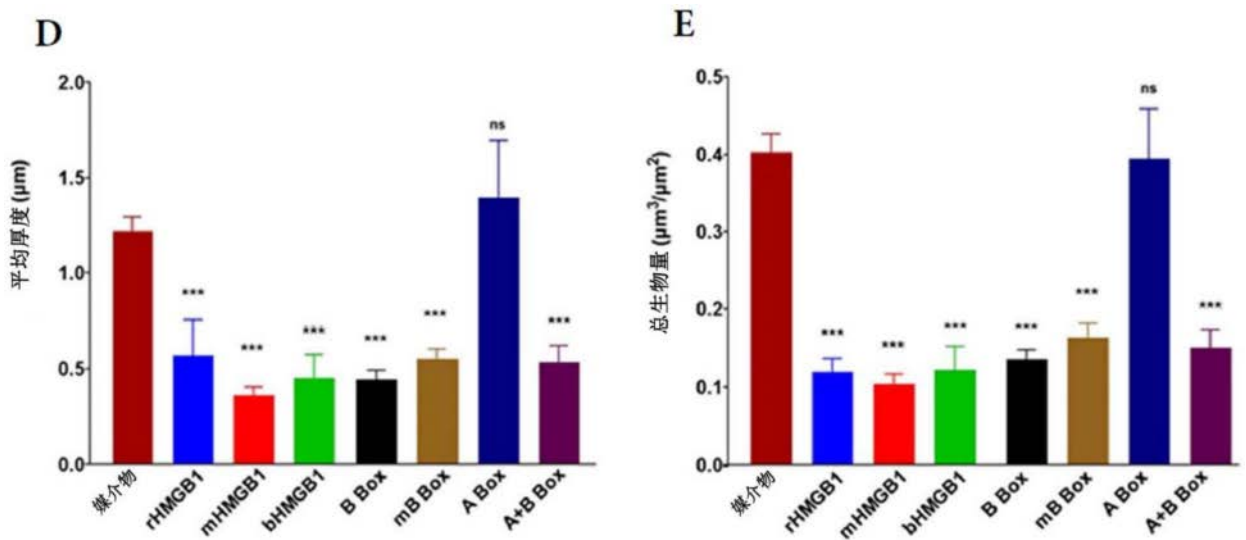


图5D-5E

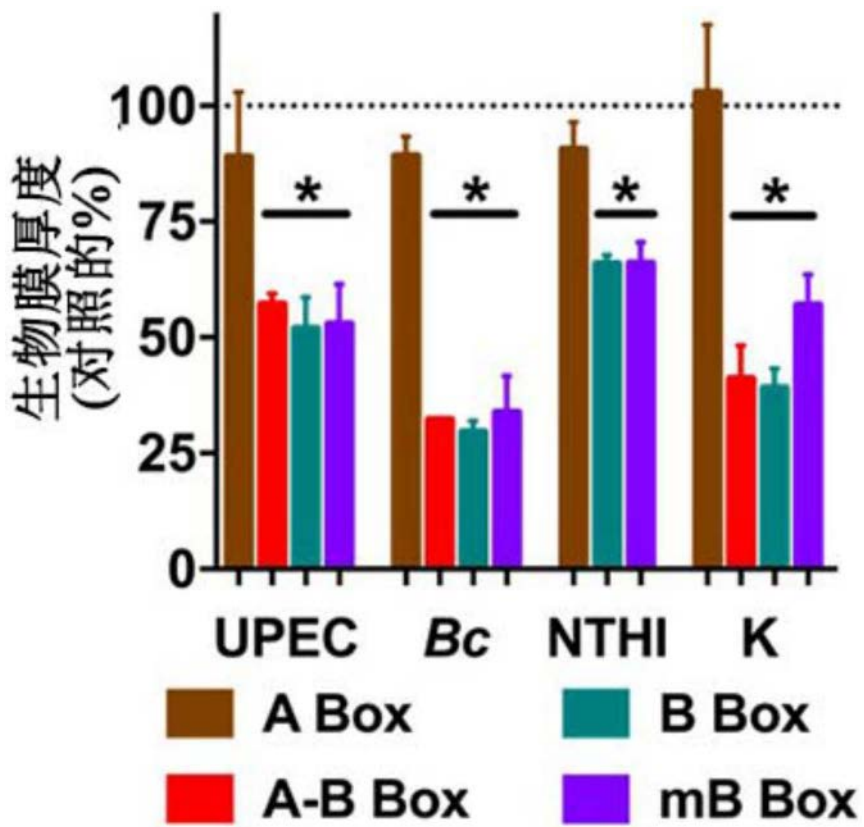


图6

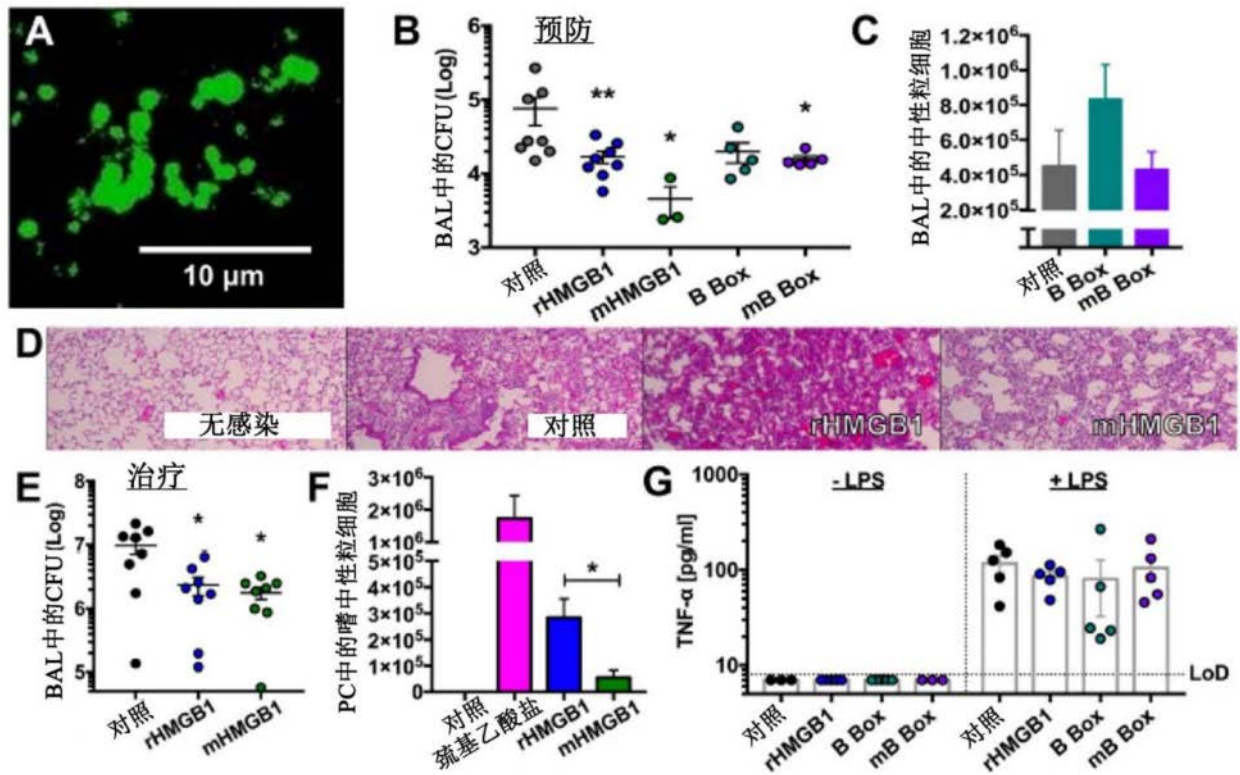


图7A-7G

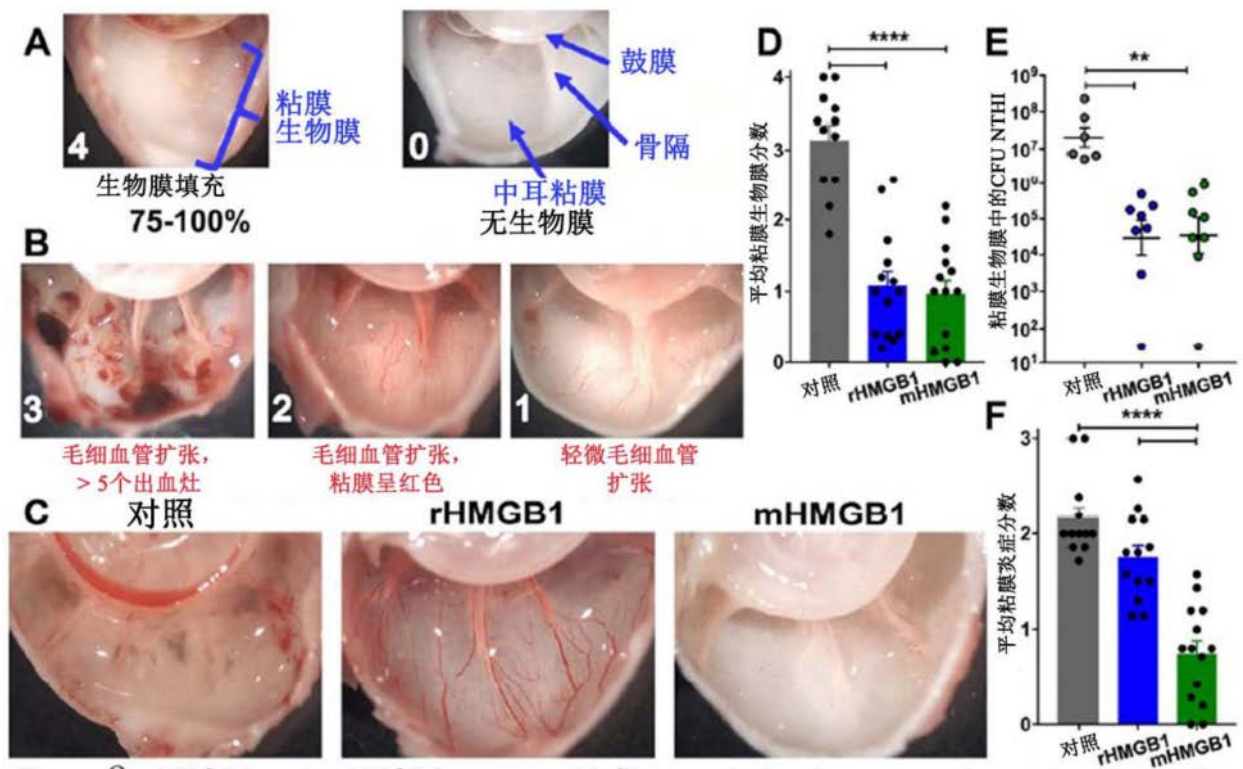


图8A-8F

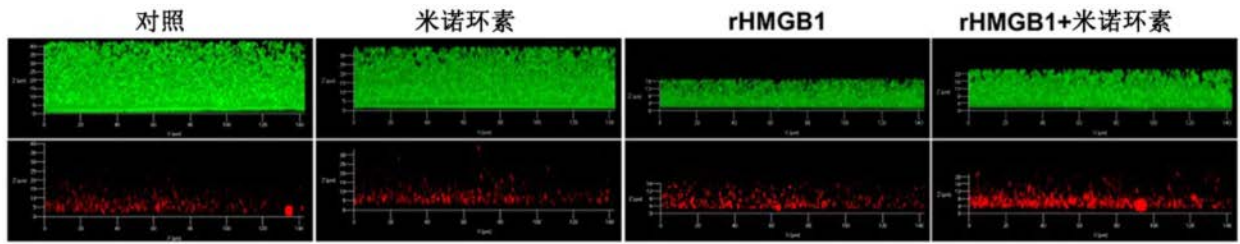


图9

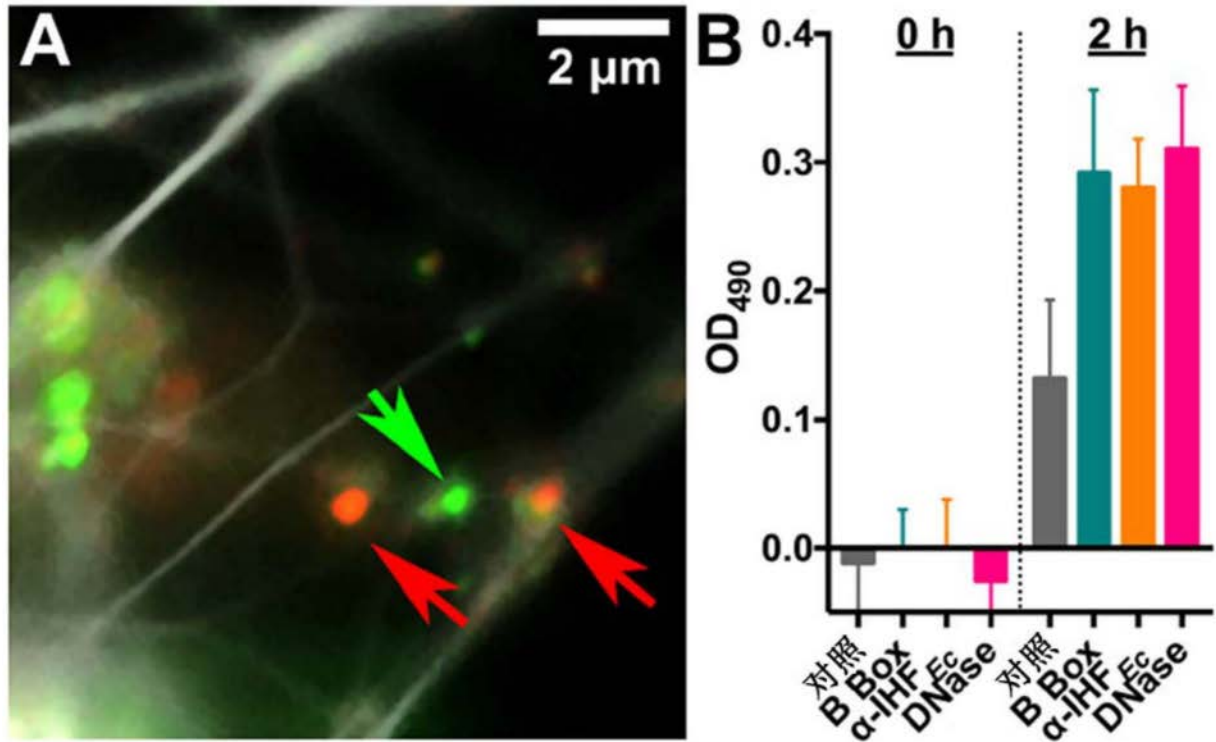


图10A-10B